

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2012

Maria Virtamo

IN VITRO -
MÄÄRITYSMENETELMÄN
KEHITTÄMINEN ALZHEIMERIN
TAUTIIN LIITETYN β -
AMYLOIDIAGGREGAATION
HAVAITSEMISEEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Maria Virtamo

IN VITRO -MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN ALZHEIMERIN TAUTIIN LIITETYN β -AMYLOIDIAGGREGAATION HAVAITSEMISEEN

Alzheimerin taudin tunnusmerkiksi on havaittu tietyn proteiinifragmentin, β -amyloidipeptidin, aggregoituminen ja kerääntyminen aivoihin amyloidiplakeiksi, mitkä ovat yhteydessä hermosolujen kuolemaan. Intensiiviset tutkimukset ovat pyrkineet selvittämään tarkkaa aggregaatioreittiä ja löytämään aineita, joilla aggregaatiota voisi kontrolloida.

Opinnäytetyön tavoitteena oli testata uuden menetelmän soveltuvuutta β -amyloidipeptidin aggregaatiotutkimuksiin ja Alzheimerin taudin lääkeaineseulontaan havainnoimalla potentiaalisten lääkeaineiden vaikutusta aggregaatioon. Menetelmä perustuu aikaerotteisen fluoresenssin resonanssienergiansiirron havainnointiin europium(III)-nanopartikkelin ja Alexa Fluor 680 -väriaineella leimatun gammaglobuliinin välillä. Menetelmässä leimattu gammaglobuliini ja analyytti kilpailevat adsorptiosta nanopartikkelin pintaan ja herkistettyä emissiota mitataan. Analyytin läsnäolo havaitaan fluoresenssin intensiteetin laskuna. Menetelmän tuloksien tulkitsemisen apuna käytettiin rinnakkaisina menetelminä tioflaviini T -fluoresenssimenetelmää ja atomivoimamikroskopiaa.

Nanopartikkelimäärittelyllä pystyttiin seuraamaan β -amyloidipeptidin fibrillisaatiota 10 mM vetykloridissa 11 $\mu\text{g/l}$ peptidikonsentraatiolla. Tulos oli yhteneväinen rinnakkaismenetelmien kanssa. Rinnakkaisiin menetelmiin verrattuna nanopartikkelimäärittelyllä pystyttiin detektoimaan jo hyvin pieniä näytemääriä (1 ng), mikä on etu kalliin reagenssin tutkimuksissa.

Tutkituilla potentiaalisilla lääkeaineilla ei havaittu aggregaatiota inhiboivia vaikutuksia nanopartikkelimäärittelyllä. Kurkumiinin aggregaatiota inhiboimaton vaikutus todettiin myös atomivoimamikroskoopiolla. Tioflaviini T -fluoresenssimenetelmä näytti selkeän aggregaatiota inhiboivan vaikutuksen, joten sen käyttö lääkeainetestauksessa on kyseenalainen. Toisaalta nanopartikkelimäärittelyksen soveltuvuutta lääkeainetesteihin ei myöskään voitu vielä luotettavasti osoittaa, sillä joidenkin lääkeaineiden läsnä ollessa havaittiin fluoresenssin nousua.

ASIASANAT:

Aikaerotteinen fluorometria, Alzheimerin tauti, atomivoimamikroskopia, β -amyloidi, fluoresenssin resonanssienergiansiirto, kurkumiini, nanopartikkeli, polyfenoliyhdisteet, tioflaviini T

Maria Virtamo

DEVELOPMENT OF *IN VITRO* ASSAY FOR DETECTION OF ALZHEIMER'S DISEASE LINKED β -AMYLOID AGGREGATION

The hallmark of Alzheimer's disease is the aggregation and accumulation of a specific protein fragment, β -amyloid peptide, into amyloid plaques in the brain which are related to the degeneration of neurons. Intensive studies have striven to unveil the precise mechanism of the aggregation pathway and to discover therapeutical substances to control the aggregation.

The objective of the thesis was to test the applicability of a novel method for the studies of β -amyloid aggregation and the drug screening of Alzheimer's disease. The novel method is based on the detection of time-resolved fluorescence resonance energy transfer between the europium(III) nanoparticle and Alexa Fluor 680 -labeled gammaglobulin. In the nanoparticle assay, the labeled protein and analyte compete for adsorption onto the surface of the particle and the sensitized emission is measured. The presence of the analyte is detected as a decreased emission signal. Thioflavin T fluorescence assay and atomic force microscopy were employed as reference methods in the interpretation of the results.

The fibrillization of the β -amyloid peptide in 10 mM hydrochloride was successfully monitored at peptide concentration 11 μ g/l by the nanoparticle assay. The result was comparable with the reference methods used. Compared with the reference methods, the analyte was detected in the nanoparticle assay at the nanogram scale, which is an advantage in studies with costly reagents.

The potential drug compounds did not inhibit the aggregation analyzed by the nanoparticle assay. The disinhibitory effect of curcumin was also demonstrated by atomic force microscopy. The thioflavin T fluorescence assay showed explicit aggregation inhibition, and therefore its utilization for drug screening is debatable. On the other hand, the suitability of the novel nanoparticle assay for drug screening could not be reliably proven in this study, because some drug compounds were found to increase fluorescence.

KEYWORDS:

Alzheimer's disease, atomic force microscopy, β -amyloid, curcumin, fluorescence resonance energy transfer, nanoparticle, polyphenol compounds, thioflavin T, time-resolved fluorometry

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 ALZHEIMERIN TAUTI JA SIIHEN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ	8
2.1 β -amyloidipeptidin synty ja rakenne	9
2.2 β -amyloidipeptidin aggregaatio	10
3 OLOSUhteiden vaikutus β-AMYLOIDIPEPTIDIIN <i>IN VITRO</i>	14
3.1 β -amyloidipeptidin aggregaatio-olosuhteita	14
3.2 β -amyloidipeptidin disaggregaatio-olosuhteita	14
3.3 Lääkeaineiden vaikutus β -amyloidipeptidin aggregaatioon	15
4 FLUORESENSSI	17
4.1 Aikaerotteinen fluorometria	19
4.2 Fluoresenssin resonanssienergiansiirto	20
5 β-AMYLOIDIEN TUTKIMUSMENETELMIÄ	22
5.1 Tioflaviini T -fluoresenssimenetelmä	23
5.2 Atomivoimamikroskopia	24
6 MENETELMÄT JA MATERIAALIT	28
6.1 Peptidin esikäsittely	28
6.1.1 Peptidin liuotus heksafluori-2-propanoliin	28
6.1.2 Peptidin liuotus 10 mM natriumhydroksidiin	29
6.2 Peptidinäytteiden valmistus	29
6.3 Nanopartikkelimääritys	31
6.3.1 Menetelmän periaate	32
6.3.2 Määrityksen suoritus	33
6.4 Tioflaviini T -fluoresenssimenetelmä	34
6.5 Atomivoimamikroskopia	35
7 TULOKSET JA ARVIOINTI	37
7.1 Inkuboitujen näytteiden vaikutus signaaliin partikkelimäärityksellä	37
7.2 Lääkeaineiden vaikutus aggregaatioon	41
7.3 Kurkumiinin vaikutus aggregaatioon	44

7.4 Fibrillisaation kinetiikkatutkimus	48
--	----

8 PÄÄTELMÄT JA POHDINTAA	52
---------------------------------	-----------

9 YHTEENVETO	56
---------------------	-----------

10 KIITOKSET	57
---------------------	-----------

LÄHTEET	58
----------------	-----------

KUVAT

Kuva 1. A β 1–42:n morfologia DMSO:ssa ja 10 mM HCl:ssä inkuboituina	41
Kuva 2. A β 1–42:n morfologia DMSO:ssa inkuboituna, z-tason korkeuskuva	41
Kuva 3. 10 mM HCl:ssä inkuboitu A β 1–42 ilman kurkumiinia ja 50 μ M kurkumiinin kanssa	47
Kuva 4. 1XPBS:ssä inkuboitu A β 1–42 ilman kurkumiinia ja 50 μ M kurkumiinin kanssa	47
Kuva 5. A β 1–42:n fibrillisaatio 10 mM HCl:ssä ajan funktiona	50

KUVIOT

Kuvio 1. β -amyloidipeptidin aggregaatio	11
Kuvio 2. NDGA:n, kurkumiinin ja tanniinihapon rakenne	16
Kuvio 3. Jablonskin diagrammi	18
Kuvio 4. Stokesin siirtymä	19
Kuvio 5. Aikaerotteisen fluorometrian periaate	20
Kuvio 6. Tioflaviini T:n rakenne	23
Kuvio 7. Atomivoimamikroskoopin periaate	25
Kuvio 8. Kilpailevan partikkeliperusteisen menetelmän periaate	32
Kuvio 9. Eu(III)-nanopartikkelin ja Alexa 680 -leimatun gammaglobuliinin eksitaatio- ja emissioaallonpituudet	33
Kuvio 10. Eri olosuhteissa inkuboitujen näytteiden vaikutus signaaliin partikkelimäärityksellä	38
Kuvio 11. Eri olosuhteissa inkuboitujen näytteiden peptidipitoisuuden vaikutus partikkelimääritykseen	39
Kuvio 12. Eri näyteolosuhteissa inkuboitujen näytteiden vaikutus signaaliin partikkelimäärityksellä	40
Kuvio 13. Lääkeaineiden vaikutus aggregaatioon 1XPBS:ssä inkuboiduissa näytteissä partikkelimäärityksellä	43
Kuvio 14. Lääkeaineiden vaikutus aggregaatioon 1XPBS:ssä inkuboiduissa näytteissä ThT -menetelmällä	44
Kuvio 15. Kurkumiinin vaikutus 1XPBS:ssä ja 10 mM HCl:ssä inkuboituihin näytteisiin partikkelimäärityksellä	45
Kuvio 16. Kurkumiinin vaikutus 1XPBS:ssä ja 10 mM HCl:ssä inkuboituihin näytteisiin ThT -menetelmällä	46
Kuvio 17. A β 1–42:n fibrillisaatiokinetiikka partikkelimäärityksellä 10 mM HCl:ssä ajan funktiona	49
Kuvio 18. A β 1–42:n fibrillisaatiokinetiikka ThT-menetelmällä 10 mM HCl:ssä ajan funktiona	49

TAULUKOT

Taulukko 1. Fibrillien muodostusta inhiboivien lääkeaineiden IC ₅₀ -arvot <i>in vitro</i>	31
--	----

KÄYTETYT LYHENTEET

APP	amyloidiprekursoriproteiini
A β	β -amyloidi
ADDL	engl. A β -derivated diffusible ligand
AFM	atomivoimamikroskopia (engl. atomic force microscopy)
AT	Alzheimerin tauti
CD	sirkulaaridikroismi (engl. circular dichroism)
CV	variaatiokerroin (engl. coefficient of variation)
DMSO	dimetyylisulfoksidi
FRET	fluoresenssin resonanssienergiansiirto (engl. fluorescence resonance energy transfer)
γ G	gammaglobuliini
HFIP	1,1,1,3,3,3-heksafluori-2-propanoli
IC ₅₀	50 % inhibitiokonsentraatio (engl. inhibition concentration)
NDGA	4,4'-(2,3-dimetyyli-1,4-butaanidiyyli)bis-1,2-bentseenidioli (engl. nordihydroguaiaretic acid)
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. phosphate-buffered saline)
SPM	engl. scanning probe microscopy
SS-NMR	kiinteän olomuodon ydinmagneettinen resonanssi (engl. solid-state nuclear magnetic resonance)
ThT	tioflaviini T (engl. thioflavin T)
TR	aikaerotteinen (engl. time-resolved)
Tris	2-amino-2-(hydroksimetyyli)propaani-1,3-dioli

1 JOHDANTO

Alzheimerin tautiin liitetyn β -amyloidiaggregaation tutkimukset ovat jatkuneet vuosikymmenien ajan. Siitä huolimatta taudin syntyyn ja etenemiseen ei ole löytynyt yksiselitteistä ratkaisua. Intensiivisillä tutkimuksilla on pyritty selvittämään aggregaation biologisista mekanismeja ja löytämään aineita, joilla voisi olla terapeuttisia vaikutuksia aggregaation ehkäisyyn.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää vaihtoehtoinen menetelmä β -amyloidiaggregaattien havaitsemiseen ja testata sen soveltuvuutta mahdollisena lääkeaineseulontamenetelmänä. Menetelmä perustuu aikaerotteisen fluoresenssin resonanssienergiansiirron havainnointiin Eu(III)-nanopartikkelin ja Alexa Fluor 680 -leimatun gammaglobuliinin välillä. Menetelmässä analyysin läsnäolo havaitaan laskeneena fluoresenssin resonanssienergiansiirtosignaalinä. Menetelmän signaalien tulkitsemisen apuna tutkimuksessa käytettiin rinnakkaismenetelminä β -amyloidiaggregaatio- tutkimuksissa yleisesti käytettyä tioflaviini T -fluoresenssimenetelmää ja atomivoimamikroskopiaa.

Tutkimuksessa analyttinä käytettiin β -amyloidin ($A\beta$) 1–42-peptidimuotoa, joka on β -amyloidimuodoista neurotoksisin. $A\beta$ 1–42:n aggregaatiota pyrittiin kontrolloimaan erilaisissa liuoksissa ja kehitettävällä menetelmällä havainnointiin, miten eri aggregaatiomuodot vaikuttivat saatavaan signaaliin. Lääkeainetesteissä potentiaalisia lääkkeitä lisättiin liuoksiin 50 μ M loppukonsentraatioon ja testattiin niiden aggregaation inhibointikykyä. Osa tutkimuksesta kärsi huonolaatuisesta näyttemateriaalista, millä oli vaikutusta tutkimustyön etenemiseen.

Opinnäytetyön empiirinen osa suoritettiin Turun yliopiston Biofysiikan laboratoriossa, joka kuuluu Turun yliopiston lääketieteelliseen tiedekuntaan. Biofysiikan laboratoriossa on kehitetty onnistuneesti viime vuosien aikana useita epäspesifisiä luminesenssiin perustuvia proteiinipitoisuusmääritysmenetelmiä.

2 ALZHEIMERIN TAUTI JA SIIHEN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ

Alzheimerin tauti on yleisin dementiaan johtava sairaus. Dementoituneista potilaista noin 80 % on todettu sairastavan Alzheimerin tautia.¹ Taudin oireita ovat erityisesti palautumaton muistin ja kognitiivisten taitojen heikkeneminen, mitkä lopulta johtavat kuolemaan. Tauti on yleisesti hitaasti etenevä, ja sen epäillään kehittyvän jopa vuosikymmenien viiveellä. Taudin eteneminen on yksilöllistä, mutta oireiden vakavuuden perusteella se voidaan jakaa kolmeen eri vaiheeseen: lievään, keskivaikeaan ja vaikeaan muotoon. Alzheimerin taudille ei ole vielä löydetty parannuskeinoa, mutta lääkkeitä taudin oireiden hoitamiseen on kehitetty.²

Alzheimerin tauti on yleistetty vanhuusiän sairaudeksi, sillä riski sairastumiseen kasvaa huomattavasti iän myötä ja Suomessa yli 85-vuotiailla sen esiintyvyys on jo 35 %. Tautia on kuitenkin todettu jo alle 60-vuotiailla, jolloin puhutaan varhaisesta puhkeamisesta. Alzheimerin tapauksista vain hyvin pieni osa on varhaisen iän tyyppiä, jonka synty on vahvasti liitetty perinnölliseen geenivirheeseen.²

Tulevaisuudessa taudin on ennustettu lisääntyvän merkittävästi erityisesti ihmisten odotetun eliniän pitenemisen myötä. Eettisten syiden lisäksi taloudelliset syyt painostavat tutkijoita löytämään keinoja taudin aikaiseen diagnosointiin ja lääkintään.³ Tautia pidetään myös elämäntapasairautena, sillä sen riskitekijöiksi on luokiteltu muun muassa kohonnut verenpaine, korkea kolesteroli, diabetes ja ylipaino. Lisäksi esimerkiksi sairastettu masennus ja alhainen koulutustaso ovat yhteydessä taudin esiintymiseen. Näin ollen terveellisillä ja aktiivisilla elämäntavoilla voi myös pienentää todennäköisyyttä sairastua Alzheimerin tautiin.^{1,2}

Vaikka taudille on luokiteltu riskitekijöitä, jotka lisäävät taudin puhkeamisen todennäköisyyttä, Alzheimerin taudin syntymekanismi on edelleen epäselvä. Taudin tunnusmerkiksi on havaittu seniilien plakkin muodostuminen aivoihin,

mitkä on todettu neuropatologisissa tutkimuksissa Alzheimerin tautia (AT) sairastaneiden aivoissa. Taudin seurauksena erityisesti tietyn proteiinifragmentin, β -amyloidipeptidin, poikkeava tuotanto soluissa lisääntyy. Tämä johtaa peptidien aggregoitumiseen ja kerääntymiseen aivoihin amyloidiplakeiksi, jotka yhdessä hermosolujen sisällä toimivan tau-proteiinin virheellisen toiminnan johdosta aiheuttavat aivojen rappeutumisen.³ Aineilla, jotka voisivat ehkäistä aggregaatiota tai hajottaa jo syntyneitä aggregaatteja, voisi tulevaisuudessa olla terapeuttisia vaikutuksia taudin hoitoon ja ennaltaehkäisyyn⁴.

2.1 β -amyloidipeptidin synty ja rakenne

Amyloidiprekursoriproteiini (APP) on solukalvoon ankkuroitunut glykoproteiini, jonka tehtävää ei vielä täysin tunneta. APP:n (100–130 kDa) proteolyysi eli entsymaattinen hajotus tapahtuu solussa kahden entsyymin toimesta. Ensimmäinen katkaisu tapahtuu joko α - tai β -sekretaasientsyymillä, jota seuraa γ -sekretaasi. Kun normaalin α -sekretaasin sijasta β -sekretaasientsyymi pilkkoo APP:n ensimmäisen osan ja γ -sekretaasi toisen, irtoaa alkuperäisestä APP:sta lyhyt β -amyloidipeptidiksi kutsuttu proteiinifragmentti, joka on noin 4 kDa kokoinen.^{3,5}

β -amyloidipeptidi voi koostua 39–43 aminohappotähteestä riippuen γ -sekretaasin leikkauskohdasta. Amyloidiplakeissa esiintyvät hallitsevat muodot ovat A β 1–40 (90 %) ja A β 1–42 (10 %). Vaikka A β 1–42:n osuus on huomattavasti pienempi kuin A β 1–40:n, sen on todettu olevan toksisempi ja suuremmassa roolissa Alzheimerin taudin kehitymisessä.^{3,5}

Kaikkien peptidimuotojen (39–43) aminohapposekvenssi on sama, mutta niiden pituus vaihtelee karboksyylipäästä. A β 1–42:n aminohapposekvenssi on NH₂-D₁AEFRHDSGYEVHHQKL_VFFAEDVGSNK₂₈GAIIGLMVGGV_VIA₄₂-COOH. A β -peptidi on amfipaattinen eli aminohappotähteet 1–28 muodostavat suhteellisen hydrofiilisen alueen ja tähteet 29–42 hydrofobisen karboksyylipään.⁴ APP:ssä hydrofiilinen alue sijoittuu solun ulkopuolelle ja hydrofobinen alue solukalvon

sisään. A β 1–42:lla (myös A β 1–40:lla) on natiivimuodossa järjestäytymätön satunnaiskierrerrakenne (engl. random coil), mutta se sisältää vesiliuoksissa myös osittain α -kierre- ja β -säierakenteita.³ Solukalvoa jäljittelevissä olosuhteissa peptidin on todettu muodostuvan suurimmaksi osaksi α -kierrerrakenteesta⁶.

α -kierre ja β -levy ovat tyypillisiä peptidien ja proteiinien järjestäytyneitä sekundaarirakenteita. α -kierteessä yhden peptidiketjun aminohapot ovat järjestäytyneet kierteiseksi rakenteeksi, missä kolmen aminohapon välein on muodostunut rakennetta vahvistava vetysidos. β -levy muodostuu rinnakkaisista peptidiketjuista, joissa vetysidokset muodostuvat ketjujen välille. β -levyn peptidiketjut voivat järjestäytyä joko samansuuntaisesti tai vastakkaisuuntaisesti. Sekundaarirakenteiden vetysidokset muodostuvat eri aminohappojen amino- ja karboksyyliyhymien välille.⁷

2.2 β -amyloidipeptidin aggregaatio

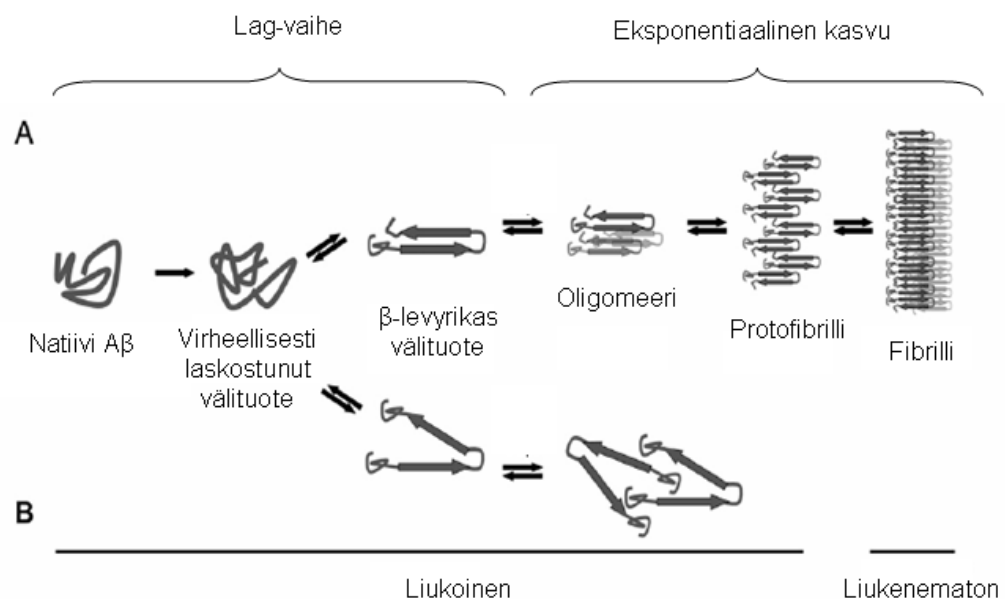
Yleisesti kaikilla proteiineilla ja peptideilla on luonnollinen taipumus aggregoitua. Aggregoitumiseen vaikuttavat molekyylin rakenne (primaari-, sekundaari-, tertiääri- ja kvaternaarirakenteet) sekä etenkin ulkoiset tekijät kuten liuoksen pH, lämpötila, konsentraatio ja ionivahvuus.⁸

Solut tuottavat normaalisti β -amyloidipeptidiä liukoisena monomeerimuotona. Liukoisilla monomeereilla on suuri taipumus kasaantua yhteen ja muodostaa oligomeerejä. β -amyloidipeptidien aminohappotähteiden lukumäärällä on merkitystä niiden aggregaatiotaipumukseen. Pidempi 1–42-muoto sisältää hydrofobisessa karboksyylipäässä enemmän aminohappoja tehden siitä hydrofobisemman A β :n lyhyempiin muotoihin nähden. Hydrofobisten vuorovaikutuksien on tutkittu olevan ratkaisevassa roolissa aggregaation etenemisessä. Tästä syystä A β 1–42 on todettu neurotoksisemmaksi kuin A β 1–40.^{3,5,9}

Kuviossa 1 A on esitetty β -amyloidipeptidin nukleaatioriippuvainen aggregaatio. Kun natiivit monomeerit kasaantuvat yhteen, niissä tapahtuu rakenteellisia

muutoksia, joiden seurauksena syntyy virheellisesti laskostuneita välituotteita. Monomeerit ja virheellisesti laskostuneet välituotteen muodostavat ytimiä, joiden muodostumisen aikana aggregaation kokonaisprosessissa on viive- eli lag-vaihe. Lag-vaiheen aikana syntyy puolistabiileja välituotteita. Lag-vaihe jatkuu, kunnes välituotteet tavoittavat kriittisen koon ja proteiinkonsentraation.^{10,11}

Kriittisen konsentraation ylittyessä välituotteet muodostavat β -levyrikkaita välituotteita. Uusien monomeerien liittyminen ytimien vapaisiin kohtiin käynnistää nopean ja termodynaamisesti suotuisan liukoisten oligomeerien synnyn, mikä johtaa edelleen järjestäytyneiden protofibrillien muodostumiseen. Lopulta protofibrillit pidentyvät ja kiertyvät limittäin muodostaen fibrillejä, jotka ovat liukenemattomia ja kiteytymättömiä. Aggregaation eri muodot esiintyvät tasapainossa (kaksisuuntaiset nuolet kuviossa 1).^{10,11}



Kuvio 1. β -amyloidipeptidin aggregaatio.¹⁰

Vaihtoehtoisessa aggregaatioreitissä (kuvio 1 B) oligomeerimuotojen β -levyrakenteiden erilainen järjestäytyminen estää niiden pidentymistä fibrilleiksi¹⁰. Näiden on todettu muodostavan liukoisia 60 kDa kokoisia

globulaarisia aggregaatteja, joissa peptidien β -levyrakenteiden hydrofiiliset aminopäävät ulospäin ja karboksyylipäävät muodostavat hydrofobisen ytimen¹².

Tutkimuksien edetessä on selvinnyt, että aggregaatio on paljon monimuotoisempi kuin monomeerien muuntuminen liukenemattomiksi β -levyrikkaiksi fibrilleiksi. Liukoisista välituotteista on löydetty monia erilaisia asteita ja muotoja, joita on nimetty eri tavoin. Liukoiksi välituotteiksi on luokiteltu muun muassa ADDL:t (engl. A β -derived diffusible ligand, 3–24 monomeerin aggregaatti, 3–6 nm)¹³, globulomeerit (15–35 nm)¹⁴ ja protofibrillit, joista kaikista puhutaan myös oligomeereina¹⁵. Oligomeerit voivat koostua joko samansuuntaisesti tai vastakkaissuuntaisesti asettuneista β -levyistä¹⁰. Protofibrillit ovat halkaisijaltaan noin 5 nm ja muodostuvat pienten globulaaristen oligomeerien liittymisestä toisiinsa yli 100 nm pituisiksi ketjuiksi¹⁶. Fibrillit ovat vasemmalle kiertyneitä, halkaisijaltaan noin 6–10 nm ja jopa 10 μ m pitkiä säikeitä, joissa β -levyt ovat järjestäytyneet samansuuntaisesti, poikittain fibrillin pituusakselia kohti, ja β -levykerroksia on päällekkäin kaksi tai enemmän. Tätä rakennetta kutsutaan poikittaiseksi β -konformaatioksi (engl. cross- β -conformation).^{3,10,11}

Nukleaattoriippuvaisen fibrillisaation kinetiikan on todettu noudattavan sigmoidaalista käyrää, jossa voidaan selkeästi erottaa viipymävaihe, eksponentiaalisen kasvun vaihe ja tasaantuva saturaatiovaihe. Jos lähtömateriaali kuitenkin sisältää aggregaatteja (fibrillejä tai protofibrillejä), ne kiihdyttävät aggregaatiota ja fibrillisaatio noudattaa 1. kertaluvun kinetiikkaa, jossa viipymävaihetta ei ole vaan kasvu on eksponentiaalista tavoittaen lopulta saturaation.^{16,17} Aika, joka eri vaiheisiin kuluu, riippuu paljon vallitsevista olosuhteista ja peptidikonsentraatiosta. Kirjallisuudessa tutkimustulosten välillä on suuria vaihteluita.^{11,17,18}

Alzheimerin taudissa lisääntyneen β -sekretaasin toiminnan seurauksena peptidiä tuotetaan yliekspressiona, joka kuormittaa hajotusmekanismia ja β -amyloidipeptidin konsentraatio kasvaa³. Konsentraation kasvun on todettu olevan merkittävässä osassa aggregaattien syntyyn AT:a sairastavan aivoissa. Normaalisti ikääntyvistä aivoista on löydetty sekä liukoisia että liukenemattomia

A β :n aggregaattimuotoja. Aggregaation liukoiset välituotteet ovat korreloineet paremmin hermosolujen kuolemaan kuin varsinaiset fibrilliplakit. Nykyään uskotaankin, että A β -aggregaation liukoiset välituotteet ovat neurotoksisempia kuin liukenemattomat fibrillit.⁵

3 OLOSUHTEIDEN VAIKUTUS β -AMYLOIDIPEPTIDIIN *IN VITRO*

In vitro -tutkimuksissa β -amyloidipeptidinäytteiden valmistuksessa on käytetty erilaisia olosuhteita, joilla on pyritty kontrolloimaan peptidin käyttäytymistä. β -amyloidipeptidi on voimakkaasti ympäristöolosuhteista riippuvainen, mikä voidaan huomata muun muassa vaihtelevissa tutkimustuloksissa. Lisäksi peptidin esikäsittelyllä on todettu olevan vaikutusta myöhempään aggregaatiokinetiikkaan.^{9,19,20}

3.1 β -amyloidipeptidin aggregaatio-olosuhteita

Aggregaatiota kiihdyttäviä olosuhteita ovat lämpötilan nosto (etenkin 37 °C), korkea suolakonsentraatio, pH 4–7 ja suuri peptidikonsentraatio.^{6,16,21} Tutkimuksissa on käytetty erilaisia liuoksia, joilla on pyritty kontrolloimaan erilaisten aggregaattimuotojen syntyä. Oligomeerimuotoisia aggregaatteja on muodostettu muun muassa Ham's F12 -mediumissa matalassa lämpötilassa (+4 °C) tai korkean suolapitoisuuden ja neutraalin pH:n liuoksissa (esimerkiksi fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa eli PBS:ssä). Kuitenkin oligomeerisaatio-olosuhteissa syntyy fibrillejä inkubointiaikaa pidennettäessä ja etenkin lämpötilaa nostettaessa. Fibrillien syntyä on todettu suosivan erityisesti pH 2²¹. Lisäksi sekoituksella on aggregaatiota kiihdyttäviä ominaisuuksia⁸.

3.2 β -amyloidipeptidin disaggregaatio-olosuhteita

Tietyissä orgaanisissa liuoksissa peptidi säilyttää natiivin satunnaiskierrarakenteensa pysyen monomeerimuotoisena. Erityisesti 1,1,1,3,3,3-heksafluori-2-propanolin (HFIP) ja dimetyylisulfoksidin (DMSO) on tutkittu olevan tällaisia liuoksia.⁹ HFIP on syövyttävä alkoholi, jonka on todettu häiritsevän hydrofobisia rakenteita ja hajottavan β -levyrakenteita. Tämän vuoksi sitä on käytetty erityisesti peptidin esikäsittelyliuoksena, jolloin saadaan

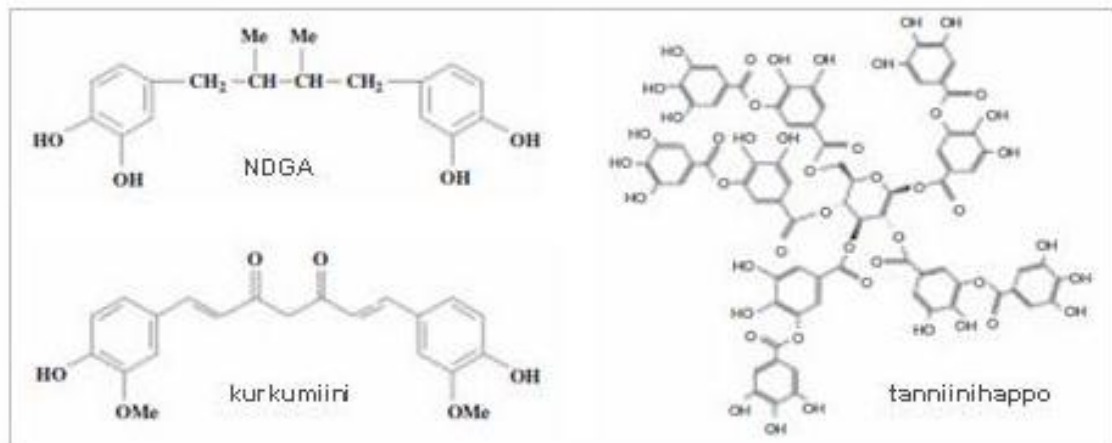
homogeeninen lähtömateriaali.²¹ DMSO on polaarinen liuotin, jolla on kyky muodostaa vetysidoksia peptidin aminoryhmien kanssa estäen β -levyrakenteen muodostumista peptidien välille. DMSO:lla on myös kyky hajottaa jo olemassa olevia β -levyrakenteita.²⁰

3.3 Lääkeaineiden vaikutus β -amyloidipeptidin aggregaatioon

Tässä lääkeaineilla tarkoitetaan tutkittuja pienmolekyylejä, joilla on todettu olevan vaikutusta aggregaatioon *in vitro* ehkäisemällä fibrillien syntymistä ja/tai hajottamalla niitä. β -amyloidiaggregaatioon vaikuttavia aineita on löydetty bioaktiivisista yhdisteistä, lääkkeistä, pinta-aktiivisista aineista, metallikelatoijista, fenotiatsiineista, sulfonoiduista väriaineista ja niiden johdannaisista.³

Lääkkeisiin kuuluva rifampisiini on antibiootti, jonka on ehdotettu sitoutuvan $A\beta$:n hydrofobiseen alueeseen estäen molekyylien kasaantumista yhteen, joka johtaisi fibrillisaatioon. Dopamiini on Parkinsonin taudin hoidossa käytetty lääkeaine, jonka on todettu *in vitro* -kokeissa inhiboivan ja hajottavan β -amyloidifibrillejä.³

Bioaktiivisiin aineisiin luokiteltavien polyfenolien joukosta on löytynyt useita aineita, joiden on todettu inhiboivan amyloidiaggregaatiota. Polyfenolien inhibitiokyvyn mekanismista on useita teorioita. Tehokkaasti inhiboivat polyfenolit ovat rakenteeltaan hyvin samanlaisia. Niissä on vähintään kaksi fenolirengasta, joissa on OH-ryhmiä ja usein atomien väliset sidokset muodostavat tasomaisen ja jäykän rakenteen (kuvio 2). Monilla polyfenoleilla, kuten tanniinihapolla, resveratrolilla ja kurkumiinilla, on antioksidatiivisia ominaisuuksia, joiden on ehdotettu liittyvän aggregaation inhibitiokykyyn.^{3,17,22}



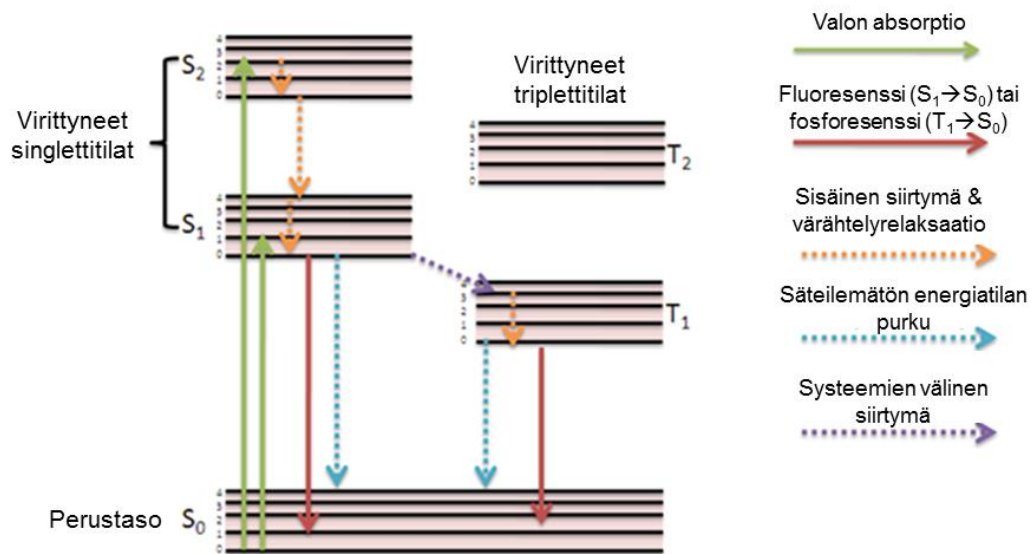
Kuvio 2. NDGA:n, kurkumiinin ja tanniinihapon rakenne.²²

Polyfenoleista esimerkiksi kurkumiinin, rosmariinihapon ja 4,4'-(2,3-dimetyyli-1,4-butaanidiyyli)bis-1,2-bentseenidiolin eli NDGA:n on ehdotettu sitoutuvan vapaaseen β -amyloidipeptidiin niiden pienen ja kompaktin koon vuoksi ja estävän fibrillien muodostumista. Vaihtoehtoisesti niiden on ehdotettu sitoutuvan spesifisesti β -levyrakenteeseen, sillä molekyylien fenolirenkaiden välinen etäisyys on sama (kuvio 2 NDGA ja kurkumiini), ja siten destabiloivan fibrillien β -levyrakennetta.^{3,17,23,24} Yhtenä käsityksenä on myös, että polyfenolien aromaattiset renkaat vuorovaikuttavat amyloidipeptidin aromaattisten ryhmien kanssa estäen fibrillien muodostumista²².

4 FLUORESENSSI

Kun materiaali altistuu säteilylle, siihen absorboituu energiaa. Absorboituneen energian määrä riippuu säteilyn aallonpituudesta ja aineen ominaisuuksista. Tietyillä atomeilla, molekyyileillä ja kompleksi-ioneilla on kyky emittoida eli säteillä niihin absorboitunutta sähkömagneettista säteilyä valona. Tätä valoilmiota kutsutaan luminesenssiksi, joka voidaan jakaa fluoresenssiin ja fosforesenssiin.²⁵

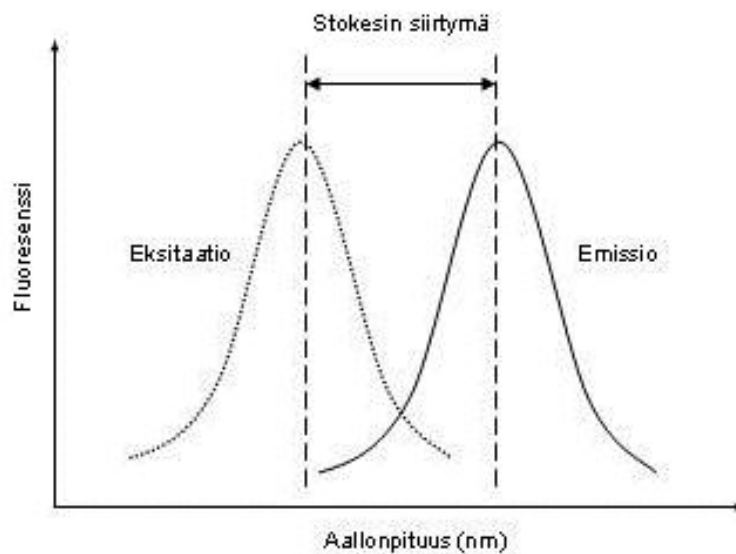
Valon absorptio aiheuttaa molekyyllissä fysikaalisen muutoksen, jossa sen elektronitaso muuttuu. Energiaminimissään molekyylin sanotaan olevan perustasossa S_0 (singlettitaso 0), mutta energian absorption johdosta molekyylin elektroni siirtyy korkeampaan eli virittyneeseen tilaan S_{1-n} (kuvio 3). Koska aineilla on taipumus pyrkiä energiainimiin, molekyyli hakeutuu mahdollisimman nopeasti takaisin perustilaan. Siirtyminen perustasoon vapauttaa virityksessä saatua energiaa eri tavoin. Siirtymisestä virittyneestä tilasta S_n matalimpaan viritystilaan S_1 puhutaan sisäisenä siirtymänä tai värähtelyrelaksaationa, jossa energiaa luovutetaan lämpönä ympäristöön. Virittyneestä tilasta S_1 siirtyminen perustilaan S_0 voi ilmetä säteilynä (fluoresenssin emissio) tai säteilemättömällä tavalla (lämpönä tai energiansiirtona toiselle molekyylille). Virittyneestä singlettitilasta S_1 energiaa voi myös siirtyä systeemien väliseksi siirtymäksi kutsutun ilmiön kautta triplettitilaan T_1 .^{26,27} Jablonskin diagrammi (kuvio 3) havainnollistaa eri energiatasojen välillä tapahtuvaa energiansiirtoa.



Kuvio 3. Jablonskin diagrammi.²⁸

Fluoresenssi on hyvin nopea ilmiö. Se tapahtuu yleensä noin 10^{-8} – 10^{-4} sekunnissa singlettitilan purkautuessa.²⁶ Luminesenssin toista ilmiötä eli fosforesenssia kutsutaan toisinaan pidennetyksi fluoresenssiksi, sillä sen emission elinikä on 10^{-3} sekunnin luokkaa. Fosforesenssin pidentynyt emissio perustuu monimutkaisempaan triplettitilan purkautumiseen.^{25,29}

Molekyylin emissioenergia on pienempi kuin absorboitunut energia, sillä energiaa menetetään muun muassa sisäisten siirtymien vuoksi. Tästä syystä molekyylin emissio havaitaan vähäenergisimmillä eli suuremmilla aallonpituuksilla kuin absorptio. Ilmiö tunnetaan Stokesin siirtymänä, joka on esitetty kuviossa 4.²⁹



Kuvio 4. Stokesin siirtymä.

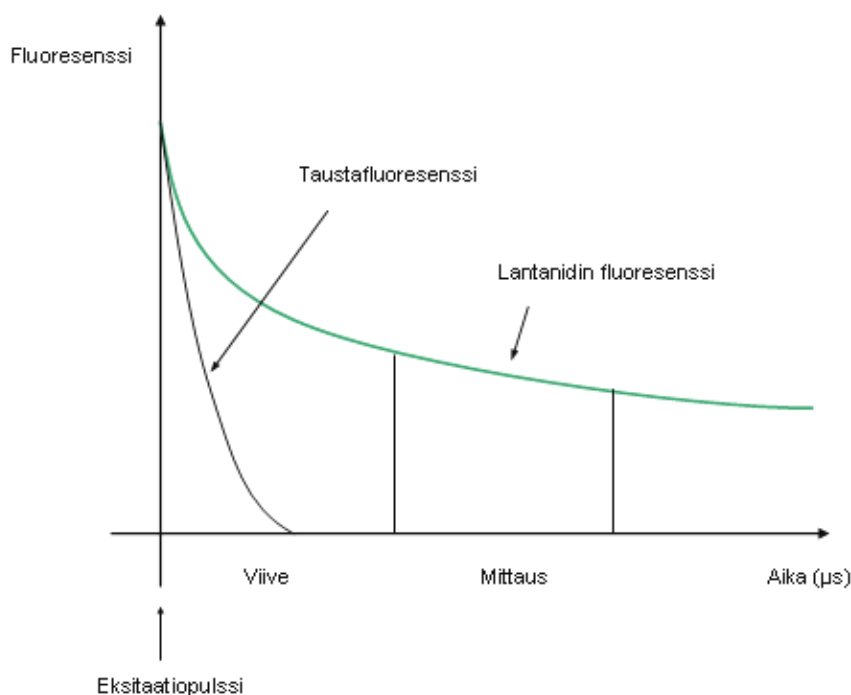
Fluoresoivilla molekyyileillä eli fluoroforeilla on ominaisia piirteitä, joilla ne pystytään erottamaan toisistaan. Molekyylikohtaisia ominaisuuksia ovat muun muassa viritys- ja emissiospektrit, emission elinikä ja kvanttisaanto eli emittoitunut energia suhteessa absorboidun valon määrään. Lisäksi ulkoiset tekijät voivat vaikuttaa fluoresenssiin kuten ympäröivän liuoksen ominaisuudet, lämpötila ja paine. Fluoresenssiin perustuvissa määrittelyissä, fluoroforien optimaalisia ominaisuuksia ovat mahdollisimman pitkä emission elinikä, kapeat ja korkeat spektriipiikit sekä pitkä Stokesin siirtymä.^{29,26,27,30}

4.1 Aikaerotteinen fluorometria

Fluorometria on yksi spektroskooppinen menetelmä, jota käytetään fluoresoivien molekyylien emissiospektrien mittaamiseen. Perinteisen fluorometrian ongelmana on usein suuri taustafluoresenssi. Taustafluoresenssia voivat aiheuttaa muuan muassa käytetyt puskurit tai biologiset yhdisteet, jotka sisältäessään luonnollisesti fluoresoivia aineita voivat häiritä mitattavaa signaalia.^{25,30}

Aikaerotteinen fluorometria on menetelmä, jolla taustafluoresenssi saadaan minimoitua. Verrattuna perinteisten fluoroforien lyhyeen emissioon

(nanosekunteja) eräät maametalleihin kuuluvat lantanidit kuten europium, terbium ja samarium fluoresoivat mikrosekunneista millisekunneihin. Tällaiset pitkäikäiset fluoroforit mahdollistavat mittauksen, joka suoritetaan vasta taustafluoresenssin sammumisen jälkeen. Kuviossa 5 on esitetty aikaerotteisen fluorometrian periaate. Molekyylien viritystä seuraa viive, jonka jälkeen pitkäikäisten lantanidien emissiota voidaan mitata taustafluoresenssin sammuttua.³⁰



Kuvio 5. Aikaerotteisen fluorometrian periaate.

4.2 Fluoresenssin resonanssienergiansiirto

Fluoresenssin resonanssienergiansiirto (engl. fluorescence resonance energy transfer, FRET) on kahden fluoresoivan molekyylin välillä tapahtuva energiansiirtoilmiö. Energian luovuttajana toimiva fluorofori, donori, viritetään tietyllä aallonpituudella. Virittyneen donorin energiatilan purkautuessa se ei fluoresoi vaan siirtää emissioenergiansa lähellä olevalle vastaanottavalle fluoroforille, akseptorille, joka virittyy ja fluoresoi energiatilan purkautuessa.

FRET-ilmiö on riippuvainen donorin ja akseptorin absorptio- ja emissiospektreistä sekä fluoroforien etäisyydestä ja suhteellisesta orientaatiosta toisiinsa. Kun akseptorina toimivan fluoroforin absorptiospektri on osittain päällekkäin donorin emissiospektrin kanssa ja fluoroforit ovat hyvin lähellä toisiaan (1–10 nm), FRET-ilmiö on mahdollinen.^{27,31}

5 β -AMYLOIDIEN TUTKIMUSMENETELMIÄ

β -amyloiditutkimukset ovat jatkuneet jo vuosikymmenien ajan. Useat rakenneanalyysi- ja kinetiikkatutkimukset ovat pyrkineet selvittämään, miten β -amyloidiaggregaation biologinen mekanismi etenee ja millaisia vaikutuksia eri asteilla on taudin kehitymisessä.⁵ Fibrillien kiteytymättömän ja liukenemattoman ominaisuuden vuoksi 3-ulotteisen rakenteen määrittämisessä ei ole voitu hyödyntää perinteistä proteiinien rakennetutkimuksissa käytettyä röntgensädekristallografia- tai ydinmagneettista resonanssimenetelmää¹⁰.

Spektroskooppiset menetelmät tarjoavat monia erilaisia mahdollisuuksia molekyylien tutkimuksiin. Ne perustuvat molekyylin ja elektromagneettisen säteilyn vuorovaikutusten havainnointiin. Kohdistamalla aineeseen säteilyä eri aallonpituuksilla molekyyli absorboi osan säteilystä ja osa säteilystä siroaa. Kohdistamalla, polarisoimalla ja detektoimalla tiettyjä aallonpituuksia voidaan saada tarkkaa tietoa molekyylin rakenteesta jopa atomitasolla.²⁷

β -amyloidipeptidin sekundaarirakenteen selvittämisessä on käytetty muun muassa sirkulaaridikroismi- (engl. circular dichroism, CD)²⁰, kiinteän olomuodon ydinmagneettista resonanssi- (engl. solid-state nuclear magnetic resonance, SS-NMR)¹⁴ ja infrapunaspektroskopiaa^{15,20}. Fibrillien kvaternaarirakenteen selvittämisessä on käytetty röntgensädediffraktiota¹⁰ ja valonsirontaa²⁰ sekä aggregaattien morfologian tutkimuksissa elektroni-^{14,17,23,24} ja atomivoimamikroskopiaa^{11,15,16,21}.

Oligomeeristen muotojen detektiossa on hyödynnetty anti-oligomeerivasta-ainetta A11, joka tunnistaa spesifisesti vain oligomeerimuotoisia aggregaatteja. Vasta-aineella 6E10 voidaan vastaavasti tunnistaa spesifisesti β -amyloidin sekvenssi.^{15,18} Western blot -analyysiä^{15,18,21,24} on käytetty aggregaattien molekyylikoon selvittämiseen ja sameusmittauksia¹⁸ muodostuneen fibrillimateriaalin määrän arviointiin.

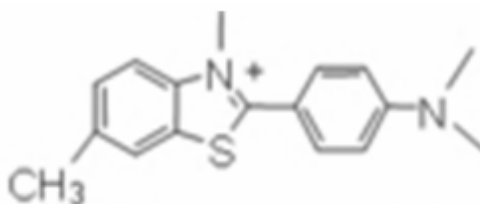
Fibrillien värjäysmenetelmät ovat luultavasti hyödynnetyimpiä aggregoituneen peptidin havainnointimenetelmiä niiden nopean ja helpon käytettävyyden

vuoksi. Polyfenoleihin kuuluvat tioflaviini T ja kongonpuna sitoutuvat spesifisesti amyloidifibrillien β -levyrakenteeseen, jolloin väreille ominaiset spektrit muuttuvat.^{17,23,32}

Tässä opinnäytetyössä käytettiin kehitettävän menetelmän rinnalla yleisesti käytettyä tioflaviini T -fluoresenssimenetelmää ja näytteiden morfologian selvittämiseksi atomivoimamikroskopiaa. Alla on kerrottu näistä menetelmistä tarkemmin.

5.1 Tioflaviini T -fluoresenssimenetelmä

Tioflaviini T (engl. thioflavin T, ThT) on fluoresoiva väriaine, jota on yleisesti käytetty amyloidiaggregaation kinetiikkatutkimuksissa. Kuviossa 6 on esitetty ThT:n rakenne. ThT:n on tutkittu sitoutuvan spesifisesti amyloidien β -levyrakenteeseen³³, joiden määrä lisääntyy voimakkaasti aggregaation myötä. A β -peptidiaggregaatiotutkimuksissa ThT:n on todettu sitoutuvan jo oligomeerisiin muotoihin³⁴. ThT muodostaa misellejä vesiliuoksissa yli 4 μ M konsentraatiossa. Misellimuotoisena ThT:n ulkopuolella on positiivisia varauksia, joiden uskotaan hydrofobisten vuorovaikutusten ohella vaikuttavan misellien sitoutumisessa fibrillien pintaan.³⁵



Kuvio 6. Tioflaviini T:n rakenne.³⁴

ThT-menetelmä perustuu tioflaviini T:n fluoresenssin havaitsemiseen. ThT:n sitoutuminen β -amyloidiaggregaatteihin aiheuttaa spektrimuutoksen, joka havaitaan emission kasvuna noin 480 nm aallonpituudella, kun molekyylit on viritetty noin 450 nm aallonpituudella. Sitoutumatonta ThT:tä ei havaita mittauksissa, sillä se fluoresoi 445 nm aallonpituudella, kun viritys on tapahtunut

385 nm aallonpituudella. ThT:llä tapahtuu siten spektraalinen siirtymä suuremmille aallonpituuksille, kun se sitoutuu amyloidiaggregaattiin.⁴

ThT-menetelmää on hyödynnetty paljon A β :n lääkeainetutkimuksissa. Koska nouseva ThT-fluoresenssi tulkitaan β -levyrakenteellisten aggregaattien lisääntymiseen, fluoresenssin laskun on oletettu indikoivan vähäisempää β -amyloidiaggregaatiota. Joidenkin lääkeaineiden on kuitenkin huomattu häiritsevän ThT-mittauksia, mikä voi johtaa virhetulkintoihin.^{18,32}

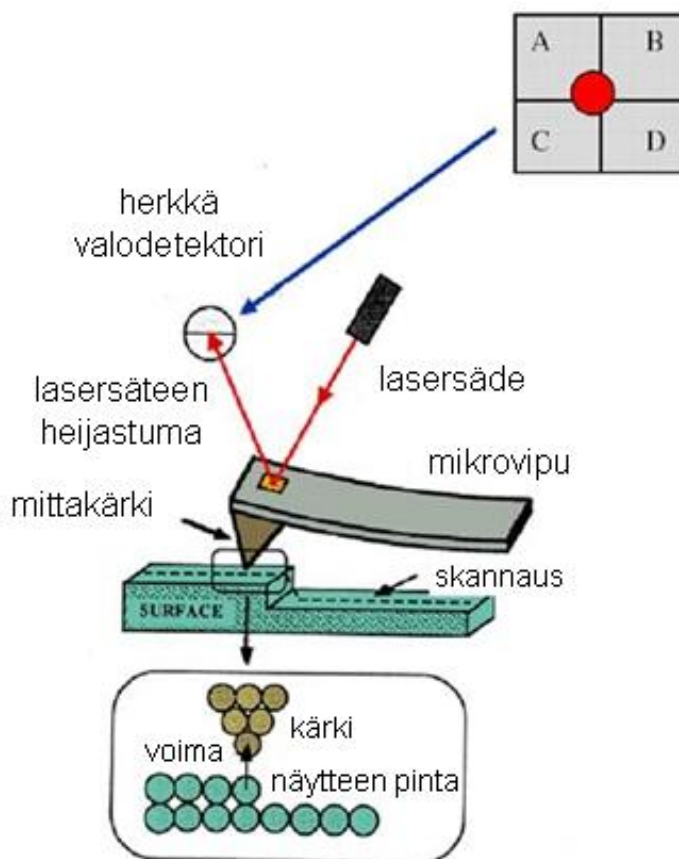
5.2 Atomivoimamikroskopia

Atomivoimamikroskoopilla (engl. atomic force microscope, AFM) voidaan erottaa pinnanmuotojen ominaisuuksia atomitasolla sähköäjohtavista ja -johtamattomista pinnoista. Lisäksi sillä on mahdollista kuvantaa näytteitä kontrolloiduissa olosuhteissa *in vitro* jopa liuoksissa.³⁶

Atomivoimamikroskopia kuuluu SPM-tekniikkaa (engl. scanning probe microscopy) hyödyntäviin menetelmiin. SPM-tekniikka on mikroskopian ala, jossa näytettä kuvannetaan skannaamalla näytteen pintaa herkällä neulamaisella mittakärjellä. Siinä ei siis käytetä perinteisen mikroskopian tapaan linsejä, vaan detektio tapahtuu näkemisen sijaan tunnustelemalla näytteen pintaa³⁷. Mikroskooppiin liitetyn takaisinkytkentäpiirin eli tietokoneen, kontrollereiden ja ohjelmiston avulla skannatun alueen informaatio voidaan muuttaa visuaaliseksi kuviksi. Koska mittaus suoritetaan x-, y- ja z-tasossa, menetelmällä saadaan kuvannettua näytteen topografiaa eli pinnanmuotoja kolmiulotteisesti.³⁶

AFM perustuu lasersäteen poikkeaman havainnointiin valodetektorilla, jota mitataan voltteina. Lasersäde kohdistetaan mittakärjen tukivarren eli mikrovivun (engl. cantilever) vapaaseen päähän ja lasersäteen heijastuma mikrovivusta kohdistetaan valodetektorille. Kun mikrovivun päässä oleva terävä mittakärki tuodaan lähelle näytteen pintaa, näytteen ja kärjen välinen vuorovaikutus aiheuttaa mikrovivun taipumisen. Mikrovivun taipuma vaikuttaa lasersäteen heijastumaan valodetektorille muuttamalla sen paikkaa ja tätä siirtymää

monitoroidaan.³⁶ AMF:n toimintaperiaatetta on havainnollistettu kuviossa 7. Valodetektori on jaettu neljään osaan, jolloin lasersäteen poikkeamat voidaan havaita hyvin herkästi. z-tasossa havaitaan pinnanmuotojen korkeusmuutokset ja x-y-tasossa sivuttaiset ja kiertyvät liikkeet.³⁷



Kuvio 7. Atomivoimamikroskoopin periaate.³⁸

Atomivoimamikroskoopin nimi viittaa mittakärjen ja pinnan atomien välisten voimien ja vuorovaikutusten läsnäoloon. Mittakärjen ja pinnan välillä vallitsee muun muassa repulsiivisia ja attraktiivisia voimia, adheesiovoimia ja etenkin liuoksesta mitattaessa kapillaarivoimia. AFM:ää voidaan käyttää useissa eri toimintatiloissa, mutta tyypillisesti ne jaetaan kontakti-, ajoittainen kontakti- ja ei-kontaktimoodiin.³⁶

Kuvantamismoodit eroavat toisistaan näytteen ja mittakärjen välisen etäisyyden sekä niiden välillä vallitsevien voimien perusteella. Valittava menetelmä riippuu yleisesti skannattavan näytteen ominaisuuksista, jotka myös vaikuttavat siihen

millaista mikrovipua käytetään. Kontaktimoodissa kärjen ja pinnan välillä vaikuttaa hylkiviä repulsiovoimia, kun taas ei-kontaktimoodissa pääasiassa attraktiovoimia.³⁶ A β -tutkimuksissa on yleisesti käytetty ajoittaista kontaktimoodia, sillä se on hellävarainen kuvantamistapa, jolla voidaan kuitenkin tavoittaa hyvin korkea resoluutio.

Ajoittainen kontaktimoodi ja kuvannus

Ajoittaisessa kontaktimoodissa mittakärjen ja näytteen välillä vallitsee molempia sekä repulsiivisia että attraktiivisia voimia. Mikrovipu säädetään värähtelemään eli oskilloimaan z-tasossa sen ominaistaajuudella tai hyvin lähellä sitä. Mikrovivun oskilloiva liike saadaan aikaan, kun skanneriin johdetaan sinimuotoista jännitettä pietsosähköiselle muuntajalle, jonka pietsokiteet aiheuttavat mikrovivun värähtelyt. Oskilloivan mittakärjen amplitudi on suurimmillaan sen oskilloidessa vapaasti ilmassa. Lähestyessä näytteen pintaa mittakärjen interaktio näytteen pinnan kanssa pienentää oskillaation amplitudia. Amplitudin vähenemä käytetään takaisinkytkentäsignaalina, jolloin signaali vahvistetaan tehostimen kautta vakioamplitudin ylläpitoa varten. Vakioamplitudin ylläpito on ratkaisevassa roolissa kuvan muodostumiselle.³⁶

Ajoittaisessa kontaktissa mittakärki koskettaa näytteen pintaa amplitudin pohjalla eli kärki hipaisee näytteen pintaa vain ajoittain. Koska oskilloivan kärjen voima on suunnattu z-tasolle, eikä sivuttaisia voimia synny, menetelmä soveltuu hyvin pehmeille näytteille.³⁶

Mikrovivun ja kärjen ominaisuudet vaikuttavat suuresti saatavan kuvan laatuun. Mikrovivun keskeisiä parametrejä ovat ominaisresonanssitaajuus (kHz), jousivakio (N/m), kärjen koko (nm) ja muoto. Mitä terävämpi mittakärki on sitä tarkempaa informaatiota pinnanmuodoista saadaan.^{36,37}

Ajoittaisessa kuvantamisessa käytettävälle mikrovivulle etsitään sen ominaisresonanssitaajuus, mutta paremman kärki-näyte-kontaktin ylläpitämiseksi arvoa siirretään hieman alle ominaistaajuuden (ajofrekvenssipoikkeama), koska resonanssitaajuus siirtyy matalammalle kärjen

tullessa kontaktiin pinnan kanssa. Ennen kuvannusta määritetään myös käytettävän huippuamplitudin korkeus eli mikrovivun haluttu oskillaatiomaksimi.³⁶

Menetelmä skannaa näytteen pintaa meno- ja tulomatkalla. Luotettavan kuvan saamiseksi näiden kahden kuvaajan (engl. trace/retrace) täytyy seurata toisiaan mahdollisimman tarkasti. Kuvannuksessa säädettäviä parametrejä ovat muun muassa skannausnopeus (Hz), suhteellinen ja integraalinen vahvistus (vaikuttavat siihen kuinka nopeasti systeemi reagoi amplitudin eroihin) sekä kosketusvoiman asetusarvo (engl. setpoint) eli kärjen ja pinnan interaktion suuruus, joka yleensä pyritään pitämään mahdollisimman pienenä. Kuvan laatuun vaikuttavat oleellisesti myös skannattavan alueen koko ja valittu pikselimäärä.³⁶

6 MENETELMÄT JA MATERIAALIT

Tutkimuksessa käytettiin analyytinä synteettistä A β 1–42-peptidiä. Peptidi esikäsiteltiin ja siitä valmistettiin näytteitä erilaisiin liuoksiin, joilla aggregaatiota pyrittiin kontrolloimaan. Kehitettävällä nanopartikkelimäärityksellä havainnointiin, miten eri aggregaatiomuodot vaikuttivat saatavaan signaaliin. Tioflaviini T -fluoresenssimenetelmää ja atomivoimamikroskopiaa käytettiin kehitettävän menetelmän tulosten tulkitsemisen apuna.

6.1 Peptidin esikäsitely

Synteettinen A β on heikosti liukeneva fysiologisiin puskureihin²⁰. Tämän vuoksi lyofilisoitua eli kylmäkuivattua peptidiä esikäsitellään orgaanisella liuottimella, kuten HFIP:llä, ennen varsinaiseen näyteolosuhteeseen liuotusta. Esikäsitelyllä pyritään poistamaan mahdolliset β -levyrakenteet ja saamaan homogeeninen lähtömateriaali, joka sisältää monomeereja.²¹ Lisäksi peptidin liuotus natriumhydroksidiin on tutkittu liuottavan peptidin hyvin ja jopa kiihdyttävän myöhempää fibrillien muodostumista³⁹.

6.1.1 Peptidin liuotus heksafluori-2-propanoliin

Lyofilisoitua biotinyloitua A β 1–42-peptidiä (Peptide 2.0, Chantilly, VA, referenssinumero 27263-761, biotinyloitu aminopäästä, molekyylipaino 4853,54 g/mol) punnittiin analyysivaa'alla lasipulloon, minkä jälkeen peptidijauhe liuotettiin vetokaapissa HFIP:hen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 1,5 g/l konsentraatioon. Lasipullo suljettiin ja peptidin liukenemista tehostettiin sonikoimalla ultraäänisonikaattorilla (Bandelin, Berliini, Saksa) 5 minuuttia, minkä jälkeen liuoksen annettiin inkuboitua 30 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen liuos vorteksoitiin koeputkiravistelijalla ja pipetoitiin lasiputkiin 20 μ l:n eriin, jolloin jokaiseen putkeen tuli 29 μ g peptidiä. HFIP:n

annettiin haihtua yön yli vetokaapissa, minkä jälkeen putket suljettiin tiiviisti parafilmillä. Peptidiputkia säilytettiin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa.²¹

Biofysiikan laboratoriossa oli aiemmin pyritty kehittämään menetelmää, joka hyödyntäisi peptidin aminopäähän liitettyä biotiiniosaa ja siksi käytetty peptidi oli biotinyloitu. Tämän ei oletettu vaikuttavan nanopartikkelimäärityksen kehityksessä, mutta tuloksissa se on selvennyksen vuoksi ilmoitettu erikseen.

6.1.2 Peptidin liuotus 10 mM natriumhydroksidiin

Testien loppuvaiheessa käytettiin toista peptidin liuotusmenetelmää uudelle A β 1-42-peptidille. 10 mM NaOH valmistettiin punnitsemalla natriumhydroksidia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) analyysivaa'alla ja liuottamalla se ultrapuhtaaseen milli-Q-veteen.

Lyofilisoitua A β 1-42-peptidiä (American Peptide Company Inc., Sunnyvale, CA, erä Z09058T1, molekyylipaino 4514,1 g/mol) liuotettiin 10 mM NaOH:iin 2,0 g/l konsentraatioon. Liuosta vorteksoitiin koeputkiravistelijalla, minkä jälkeen peptidiliuos pipetoitiin mikrosentrifugiputkiin 25 μl :n eriin. Putket tiivistettiin parafilmillä ja siirrettiin $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen.⁴⁰

6.2 Peptidinäytteiden valmistus

Valittiin erilaisia näyteolosuhteita, joissa aggregaatiota on tutkittu tapahtuvan. DMSO:ssa aggregaatiota ei pitäisi tapahtua tai aggregaatio on hidasta, joten se valittiin vertailunäytteeksi.²¹ Lisäksi 10 mM NaOH:lla esikäsiteltyjen peptidinäytteiden valmistuksessa vertailunäytteeksi otettiin myös 10 mM NaOH.

Tutkittuja näyteolosuhteita olivat:

- DMSO (puhtaus yli 99,9 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- 1XPBS (7 mM fosfaatti, 150 mM NaCl, pH 7,4)
- 10 mM HCl + 150 mM NaCl (pH 2)
- Milli-Q-vesi (pH 7)

- 10 mM HCl (pH 2)
- 10 mM NaOH (pH 12)

HFIP:llä esikäsiteltyjä peptidiputkia otettiin tarvittavasta näytemäärästä riippuen $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:sta. Jokaiseen putkeen lisättiin 15 μl DMSO:ta ja putkessa olevan peptidifilmin liukenemista edistettiin sonikoimalla 3 minuuttia. Putket vorteksoitiin koeputkiravistelijalla ja putkien sisältämä liuos yhdistettiin pipetoimalla peptidiliuos yhteen putkeen. Tästä peptidiliuoksesta (1,9 g/l) valmistettiin 0,15 g/l näytelaimennokset mikrosentrifugiputkiin eri näyteolosuhteisiin (DMSO, 1XPBS, milli-Q-vesi, 10 mM HCl + 150 NaCl ja 10 mM HCl). Putket tiivistettiin haihtumisen estämiseksi parafilmillä ja näytteet siirrettiin $37\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen inkubointihuoneeseen tasoravisteliijaan (250 rpm, Certomax, MO). Näytteitä inkuboitiin sekoituksella $37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 1 vrk.

10 mM NaOH:iin liuotetusta peptidistä (2,0 g/l) valmistettiin 0,2 g/l laimennokset mikrosentrifugiputkiin eri näyteolosuhteisiin (DMSO, 10 mM NaOH, 1XPBS ja 10 mM HCl). Laimennoksiin jäänyt 1 mM NaOH ei muuttanut näyteliuoksien lopullista pH:ta. Putket tiivistettiin parafilmillä ja näytteitä inkuboitiin $37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa tasoravistelijassa (250 rpm) 1 vrk.

Vaikka tarkoituksena oli erottaa monomeerinen näyte (DMSO) aggregaattinäytteistä, kaikkia näytteitä inkuboitiin $37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 1 vrk (250 rpm), jotta olosuhteiden vaikutusta voitiin verrata paremmin toisiinsa. Näytteitä valmistettiin yleensä testikohtaisesti, joten reaktiivilavuudet inkuboitessa vaihtelivat noin 29–55 μl välillä.

Tutkittaviksi lääkeaineiksi valittiin saatavuuden mukaan sellaisia aineita, joiden on todettu inhiboivan aggregaatiota jo matalissa konsentraatioissa. Taulukossa 1 on koottu testattujen potentiaalisten lääkeaineiden IC_{50} -konsentraatiot, joissa lääkeaineiden fibrillien muodostusta inhiboiva vaikutus on 50 % verrattuna näytteeseen, joka ei sisällä lääkeainetta.

Tutkittuja lääkeaineita olivat:

- Kurkumiini (Tocris, Ellisville, MO)

- Tanniinihappo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Rifampisiini (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ)
- Dopamiini hydrokloridi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- NDGA (Acros Organics, Fair Lawn, NJ)
- Resveratroli (MP Biomedicals, LLC, Solon, OH)
- Rosmariinihappo (MP Biomedicals, LLC, Solon, OH)

Taulukko 1. Fibrillien muodostusta inhiboivien lääkeaineiden IC₅₀-arvot *in vitro*.^{3,22}

Luokka	Lääkeaine	IC ₅₀ (μM)
Polyfenoli	Kurkumiini	0,63-1,1
	NDGA	0,74-1,1
	Tanniinihappo	0,022
	Rosmariinihappo	1,1
	Resveratroli	-
Hormoni	Dopamiini	0,04
Antibiootti	Rifampisiini	9,1

Lääkeainetesteissä lääkeaineita pipetoitiin näyteliuoksiin 50 μM konsentraatioon ennen peptidin lisäystä. Varastolääkeaineliuokset valmistettiin liuottamalla kiinteät lääkeaineet DMSO:hon 10 tai 20 mM konsentraatioon. Lääkeaineliuosten korkealla varastokonsentraatiolla minimoitiin DMSO:n määrä näyteliuoksiin laimennettaessa.

6.3 Nanopartikkelimääritys

Nanopartikkelimääritys on kehitetty Biofysiikan laboratoriossa. Menelmällä on onnistuneesti detektoitu BSA-proteiinin aggregaatiota ajan funktiona jo hyvin pienissä pitoisuuksissa.⁴¹ Opinnäytetyön tarkoituksena oli soveltaa menetelmän käyttöä β-amyloidipeptidin aggregaatiotutkimuksiin. Alla on kerrottu yksityiskohtaisemmin kehitetyn nanopartikkelimäärityksen periaate ja miten määritys suoritettiin.

6.3.1 Menetelmän periaate

Kehitetty nanopartikkelimenetelmä hyödyntää aikaerotteista FRET-ilmiötä. Menetelmässä energian luovuttajana eli donorina toimii Eu(III)-nanopartikkeli ja energian vastaanottajana eli akseptorina Alexa Fluor 680 -leimattu gammaglobuliini (γ G-Ax680). Menetelmä on epäspesifinen kilpaileva määrittäminen, jossa analyytti ja γ G-Ax680 kilpailevat sitoutumisesta Eu(III)-partikkelin pintaan ja leiman herkistettyä emissiota mitataan.

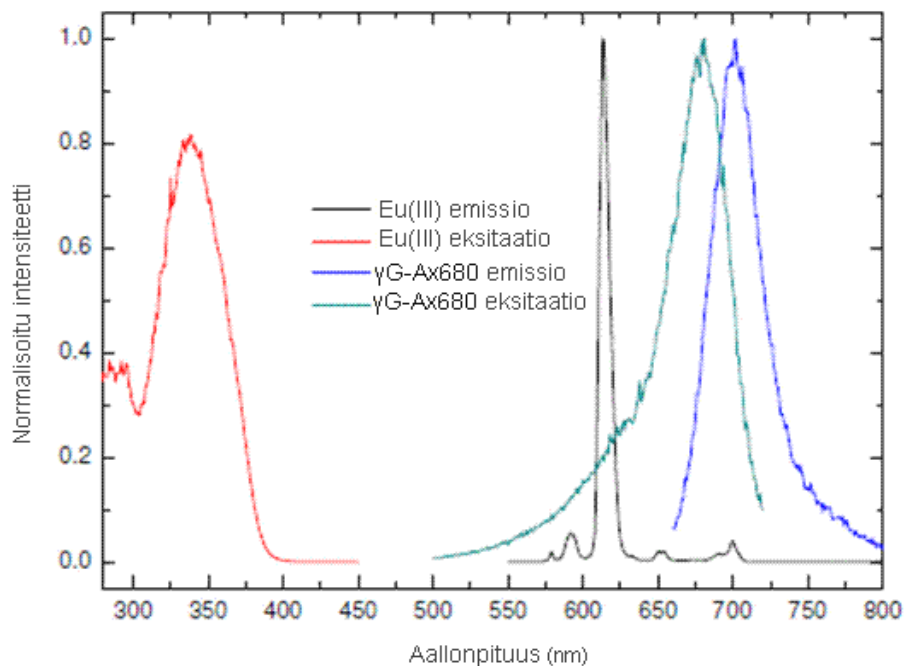
Partikkelimäärittäminen periaate on havainnollistettu kuviossa 8. Monomeerisen ja aggregoituneen näytteen välinen ero havaitaan fluoresenssin signaalitason erona. Monomeerimuotoinen peptidi täyttää partikkelin pinnan siten, ettei γ G-Ax680 mahdu adsorboitumaan, jolloin energiansiirtoa ei tapahdu tai se on vähäistä ja signaali on matala. Kun mitataan aggregoitua peptidiä samalla konsentraatiolla, nanopartikkelin pinta ei täyty yhtä tiheästi ja γ G-Ax680 mahtuu adsorboitumaan partikkelin pinnalle, mikä havaitaan fluoresenssin nousuna. Kontrollinäytteessä eli näytteessä, joka ei sisällä analyyttiä, energiansiirtosignaali on maksimissaan.



Kuvio 8. Kilpailevan partikkeliperusteisen menetelmän periaate.

Kuviossa 9 on esitetty käytettävän Eu(III)-nanopartikkelin ja γ G-Ax680:n viritys- ja emissiospektrit. Kuvioista voidaan huomata, että Eu(III)-partikkelin emissio- ja γ G-Ax680:n virityspiikit osuvat päällekkäin, mikä mahdollistaa FRET-ilmiön molekyylien välillä. γ G-Ax680:n emissiomaksimi on noin 700 nm

aallonpituudella. Kyseisellä aallonpituudella Eu(III)-partikkelilla on pieni fluoresenssiipikki (kuvio 9). Taustan minimoimiseksi menetelmässä käytetään 730 nm emissioaallonpituutta, jossa γ G-Ax680:n emissio on kuitenkin vielä korkea.



Kuvio 9. Eu(III)-nanopartikkelin ja Alexa 680 -leimatun gammaglobuliinin eksitaatio- ja emissioaallonpituudet.⁴²

Menetelmässä käytettävän puskurin pH on 2, jolloin γ G-Ax680 ja A β 1–42 ovat varautuneet positiivisesti (γ G:n isoelektrinen piste on 6,8–8,8⁴³ ja A β 1–42:n 5,31⁴⁴). Käytetyn nanopartikkelin pinta on varautunut negatiivisesti, joten proteiinin ja peptidin adsorptio nanopartikkelin pintaan perustuu pääasiassa elektrostaattisiin vuorovaikutuksiin.

6.3.2 Määrittelyn suoritus

Määrittelyssä käytettiin pinnalta karboksylaattimodifioituja Eu(III)-polystyreenipartikkeleita (Seradyn Inc., Indianapolis, IN), joiden halkaisija oli 68 nm. Määrittelyssä käytetty γ G-Ax680 oli valmistettu Biofysiikan

laboratoriossa. Alexa Fluor 680 on kaupallinen fluoresoiva väriaine, jonka molekyylikoko on noin 1,2 kDa⁴⁵ ja γ G on verestä eristetty proteiini, jonka molekyylipaino on noin 160 kDa⁴³.

Partikkelimäärityksessä käytettiin 96-kuoppalevyä (Low Fluor Maxi, Nunc, Roskilde, Tanska). Kaivoon pipetoitiin 70 μ l 5 mM glysiinipuskuria (pH 2), 4 μ l näytelaimennosta, 10 μ l Eu(III)-partikkelilaimennosta ($2,6 \times 10^6$ kpl/ μ l) ja 10 μ l γ G-Ax680-laimennosta (0,8 mg/l), jolloin kokonaistilavuus kaivossa oli 94 μ l. Jokaisen reagenssilisäyksen jälkeen levyä ravisteltiin muutama sekunti kuoppalevyravistelijalla. Lopuksi levy mitattiin Victor²-monileimalaitteella (Wallac, Turku, Suomi). Mittauksessa käytettiin 340 nm viritysaallonpituutta ja emissio detektoitiin 730 nm aallonpituudella. Mittaus suoritettiin eksitaatiopulssin jälkeen 75 μ s viiveellä ja emissiota mitattiin 50 μ s ajan. Määrityksen suoritukseen kuluva aika oli tyypillisesti noin 30 minuuttia.

Kaikki partikkelimääritystä varten suoritettavat laimennokset valmistettiin milli-Q-veteen. HFIP:llä esikäsitellyistä peptidinäytteistä (0,15 g/l) valmistettiin useimmiten 1:300 laimennokset ennen levyllä pipetointia, jolloin alkuperäisen inkubointiliuoksen määrä kaivossa oli noin 0,01 %, peptidipitoisuus 21 μ g/l ja lääkeainetesteissä lääkeaineen loppupitoisuus 7,1 nM. 10 mM NaOH:lla esikäsitellyistä peptidinäytteistä (0,2 g/l) valmistettiin 1:400 laimennokset ennen levyllä pipetointia, jolloin alkuperäisen inkubointiliuoksen määrä kaivossa oli 0,01 %, peptidipitoisuus 21 μ g/l ja lääkeainetesteissä lääkeaineen loppupitoisuus 5,3 nM. Näytteistä pipetoitiin kolmet rinnakkaiset ja tulosten analysointiin käytettiin arvojen keskiarvoa.

6.4 Tioflaviini T -fluoresenssimenetelmä

ThT-testiä varten valmistettiin ThT-varastoliuos. ThT:tä (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) punnittiin analyysivaa'alla ja liuotettiin DMSO:hon 7 mM konsentraatioon. Liuosta säilytettiin +6 °C:ssa. Määrityksissä käytettiin 5 μ M ThT-fosfaattipuskuria (1XPBS, pH 7,4), joka valmistettiin aina juuri ennen määrityksen suoritusta.

Mustalle 96-kuoppalevyille (Perkin Elmer) pipetoitiin 200 µl 5 µM ThT - fosfaattipuskuria. Näytteitä pipetoitiin 8 tai 10 µl inkubointikonsentraatiossa (0,15 tai 0,2 g/l) kahdet rinnakkaiset, jolloin kokonaistilavuus kaivossa oli 208 tai 210 µl. Levyä ravisteltiin muutama sekunti levyravistelijassa ja ThT:n fluoresenssin intensiteetti mitattiin Tecan infinite 200 -levylukijalla (Tecan Austria GmbH, Gröding, Itävalta) 490 nm aallonpituudella viritysaallonpituuden oltua 445 nm. HFIP:llä esikäsitellyillä näytteillä inkubointiliuoksen määrä kaivossa oli 4,8 %, peptidipitoisuus 7,1 mg/l ja lääkeainetesteissä lääkeaineen loppupitoisuus 2,4 µM. 10 mM NaOH:lla esikäsitellyillä näytteillä inkubointiliuoksen määrä kaivossa oli 3,8 %, peptidipitoisuus 7,7 mg/l ja lääkeainetesteissä lääkeaineen loppupitoisuus 1,9 µM.

Fibrillisaation kinetiikkamittauksessa käytettiin muista ThT-testeistä poiketen 10 µM ThT-liuosta (20 mM Tris, pH 8), jota pipetoitiin kaivoihin 200 µl. Näytteitä pipetoitiin levyille inkubointikonsentraatiossa (0,2 g/l) 8 µl kahdet rinnakkaiset. Virityksessä käytettiin 450 nm viritysaallonpituutta ja emissio detektoitiin 490 nm aallonpituudella.

6.5 Atomivoimamikroskopia

Atomivoimamikroskooppia käytettiin β-amyloidiaggregaattien morfologian kuvantamiseen eri näyteliuksissa. Näytteitä pipetoitiin inkubointikonsentraatiossa (0,15 tai 0,2 g/l) 5–10 µl substraattina toimivalle puhtaalle kiillemineraalin (mican) pinnalle. Mica on luonnonmineraali, joka koostuu hyvin ohuista kerroksista. Teipin avulla voitiin irrottaa päällimmäiset kerrokset, jolloin saatiin puhdas ja tuore pinta. Mican pinta on atomitasoisen sileä, hydrofiilinen ja neutraaleissa vesiliuksissa negatiivisesti varautunut³⁷. Näytteitä inkuboititiin mican pinnalla 30 minuuttia huoneenlämmössä. Koska näytetilavuus oli suhteellisen pieni, inkubointiastiaan lisättiin vedellä kostutettua paperia haihtumisen estämiseksi. Inkuboinnin jälkeen mican pinta huuhdeltiin vedellä ja pinta kuivattiin hellävaraisesti typpikaasulla. Näytteitä säilytettiin huoneenlämmössä soluviljelymaljoissa pölyltä suojassa ennen kuvantamista.

Näytteitä kuvannettiin Agilent Technologies 5500 SPM -sarjan komponenteilla (Agilent Technologies Inc., Yhdysvallat) ajoittaisella kontaktimoodilla. Kuvannuksessa käytettiin NSC19/no Al -mikrovipua (MikroMasch, Tallinna, Viro), jonka jousivakio on 0,63 N/m, kärjen kaarevuussäde alle 10 nm ja ominaisresonanssitaajuus 80 kHz.

Ennen jokaista kuvantamista haettiin mikrovivun ominaisresonanssitaajuus, asetettiin ajofrekvenssipoikkeamaksi $-0,100$ kHz ja huippuamplitudiksi $1,0-3,0$ V. Kuvantamisparametrit optimoitiin jokaiselle näytteelle erikseen ja kosketusvoima pyrittiin pitämään mahdollisimman alhaisena. Kuvantamisnopeutena käytettiin $0,5-1,0$ Hz ja kuva muodostettiin 512×512 , 1024×1024 tai 2048×2048 pikselin resoluutiolla. Näytteistä kuvannettiin vähintään kaksi kohtaa, millä varmistettiin näytteen tasalaatuisuus. Kuvattava alue vaihteli $2 \times 2-5 \times 5 \mu\text{m}^2$ välillä. Kuvat käsiteltiin PicoView 10.1 -ohjelmistolla (Agilent Technologies Inc., Yhdysvallat) käyttämällä pinnan kaarevuuden poistavaa suodatusta.

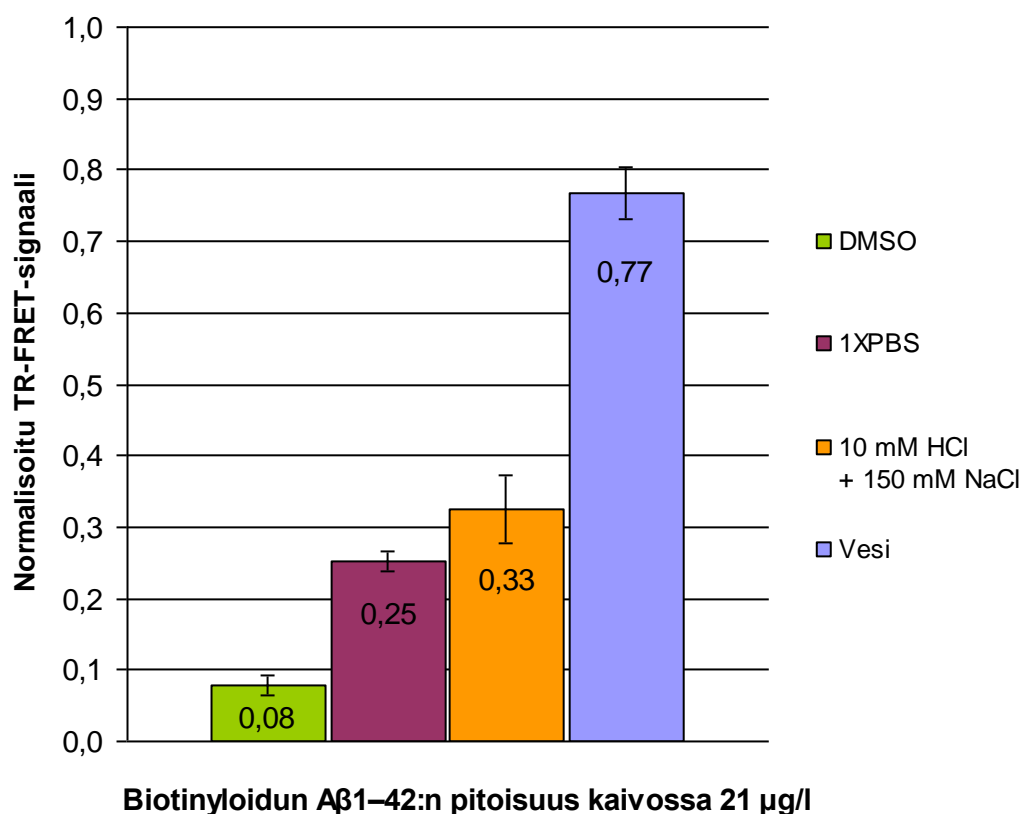
Kuvista analysoitiin lähinnä peptidin morfologiaa ja aggregaattien kokoa z-tason korkeuskuvan mukaan. x-y-tasossa koon arvioinnissa pitää ottaa huomioon muun muassa valittu resoluutio ja kuvannusalueen koko. Jos pikselimääräksi valitaan esimerkiksi 512×512 ja kuvannusalueeksi $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, yksi pikseli vastaa 4 nm .³⁶ x-y-tason mittakaavaa käytettiin peptidien koon arvioinnissa vain suuntaa antavana.

7 TULOKSET JA ARVIOINTI

7.1 Inkuboitujen näytteiden vaikutus signaaliin partikkelimäärityksellä

Nanopartikkelimäärityksen tulokset on esitetty normalisoituina TR-FRET-signaaleina. Normalisoitu signaali on näytteen ja taustan (nollanäyte) suhdeluku toisiinsa. Taustan suhdeluku on aina 1, jolloin γ G-Ax680:en adsorptio nanopartikkeleihin on maksimissaan. Mitä pienempi suhdeluku on sitä enemmän analyytti peittää Eu(III)-partikkelin pintaa estäen γ G-Ax680:n adsorption. Tulokset on laskettu kolmen rinnakkaisen näytteen keskiarvona ja virhepalkit on laskettu rinnakkaisten mittausten variaatiokertoimista (CV).

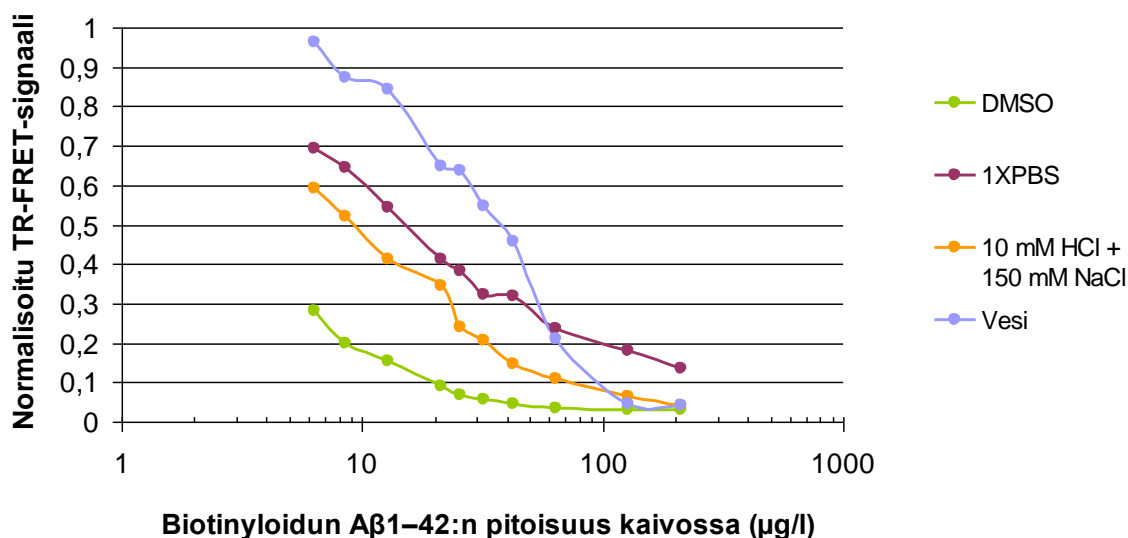
Kehitetyllä partikkelimääritysmenetelmällä suoritettiin monia mittauksia, joissa pyrittiin erottamaan oletettu monomeerinäyte (DMSO) aggregaatio-olosuhteissa inkuboiduista näytteistä. Tulosten välillä huomattiin vaihtelua testistä toiseen, mutta useimmiten testin sisällä näytteiden välinen suhde pysyi suunnilleen samanlaisena. Kuviossa 10 on esitetty tyypilliset näytteiden välille saadut erot partikkelimäärityksellä. Tuloksissa DMSO:ssa inkuboidussa näytteessä signaali oli matalin, jolloin näytteen oletettiin sisältävän suurimmaksi osaksi mono- tai pieniä oligomeerimuotoisia peptidejä. 1XPBS ja 10 mM HCl + 150 mM NaCl -näytteissä signaali oli jonkin verran korkeampi DMSO-näytteeseen nähden, mistä päätellen näytteet sisälsivät suurempia aggregaatteja. Vesinäytteessä signaali oli selvästi korkeampi muihin näytteisiin nähden. Kuitenkin testien aikana huomattiin, että suuremmissa peptidipitoisuuksissa vesi- ja DMSO-näyte antoivat samantasoisien signaalien muiden näytteiden antaessa hieman korkeamman.



Kuvio 10. Eri olosuhteissa inkuboitujen näytteiden vaikutus signaaliin partikkelimäärityksellä.

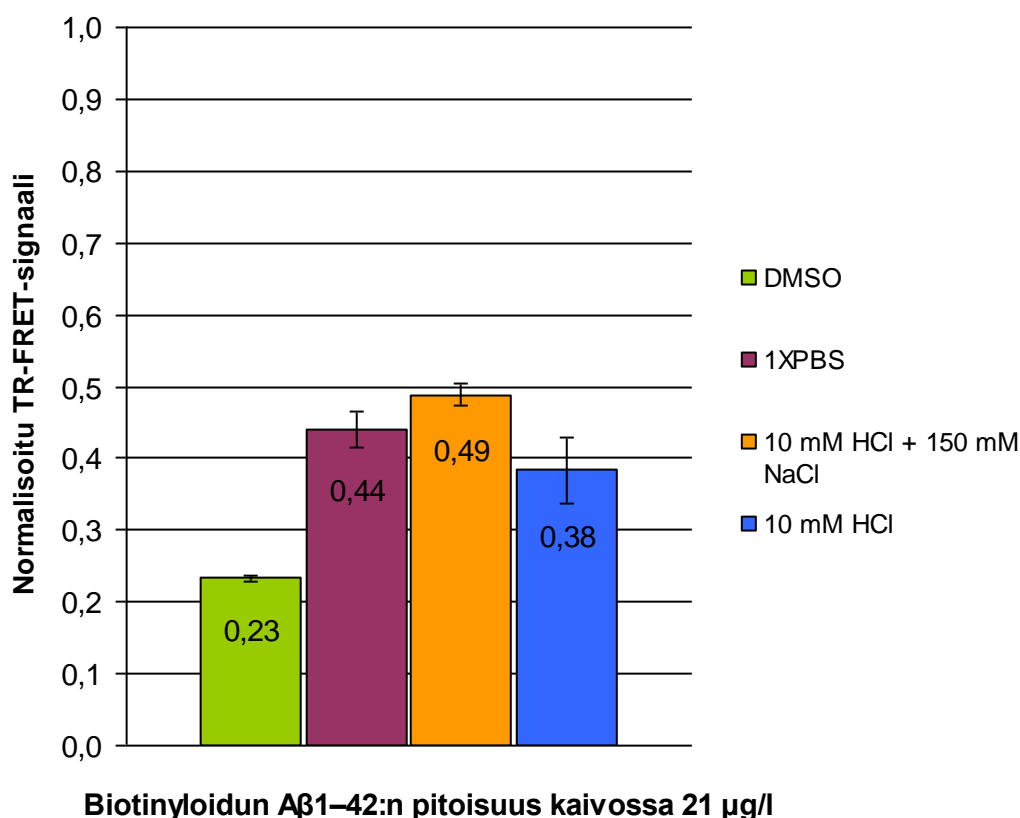
Testattiin, eroavatko näytteiden dynaamiset alueet toisistaan valmistamalla laimennossarja jokaisesta näytteestä. Kuviossa 11 on esitetty eri olosuhteissa inkuboitujen peptidien tulokset, kun kaivossa oleva peptidikonsentraatio oli 6–210 µg/l. Käyristä ei voitu päätellä näytteiden dynaamista aluetta, sillä maksimia ei saavutettu. Oletuksena oli löytää konsentraatio, jossa DMSO-näytteen signaali olisi matala ja muiden olosuhteiden signaalit korkeita. DMSO-näyte antoi jokaisessa konsentraatiossa matalimman signaalin, mutta ero muihin näytteisiin ei ollut niin selkeä kuin odotettiin. Ainostaan vesinäytteen ero muihin näytteisiin nähden oli selkeä 60 µg/l pienemmillä pitoisuuksilla. Vesinäyte koostui vain peptidistä ja vedestä, joten se ei sisältänyt muita komponentteja kuten suoloja. Koska muiden näytteiden signaalinousu oli tasaisempaa ja suhteessa samanlaista, saattaa olla, että alkuperäisellä inkubointiolosuhteella oli vaikutusta määrittelyyn. Tämä on kuitenkin epätodennäköistä, koska

korkeimmassakin konsentraatiossa (210 µg/l) alkuperäisen inkubointiolosuhteen osuus kaivossa oli hyvin pieni (0,1 %). Tuloksista voidaan kuitenkin myös nähdä, että menetelmä pystyi detektoimaan peptidiä hyvin pienissä pitoisuuksissa.



Kuvio 11. Eri olosuhteissa inkuboitujen näytteiden peptidipitoisuuden vaikutus partikkelimääritykseen.

Vaikka vesinäyte erosi selkeimmin partikkelimäärityksellä, sen lisätutkimuksia ei jatkettu. β-amyloidipeptidin tutkimuksissa 1XPBS on yleisesti käytetty liuos aggregaattien muodostukseen, joten tutkimus kohdistettiin erityisesti tähän olosuhteeseen. Mukaan otettiin myös 10 mM HCl -näyteolosuhde, jonka on todettu suosivan erityisesti fibrillien muodostusta. Kuviossa 12 on esitetty tulokset partikkelimäärityksestä, jossa oli mukana 10 mM HCl -näyte. Verrattaessa näitä tuloksia kuvion 10 tuloksiin näytteiden väliset signaalierot testien sisällä olivat keskenään samantyyppisiä, mutta havaitun fluoresenssin intensiteetti oli kuvion 12 tuloksissa suhteellisesti korkeampi. Kuviossa 10 1XPBS-näytteen signaali oli 0,25 ja DMSO-näytteen 0,08 (näytteiden välinen suhdeluku 3), kun taas kuviossa 12 1XPBS-näyte antoi signaaliksi 0,44 ja DMSO-näyte 0,23 (suhdeluku noin 2).

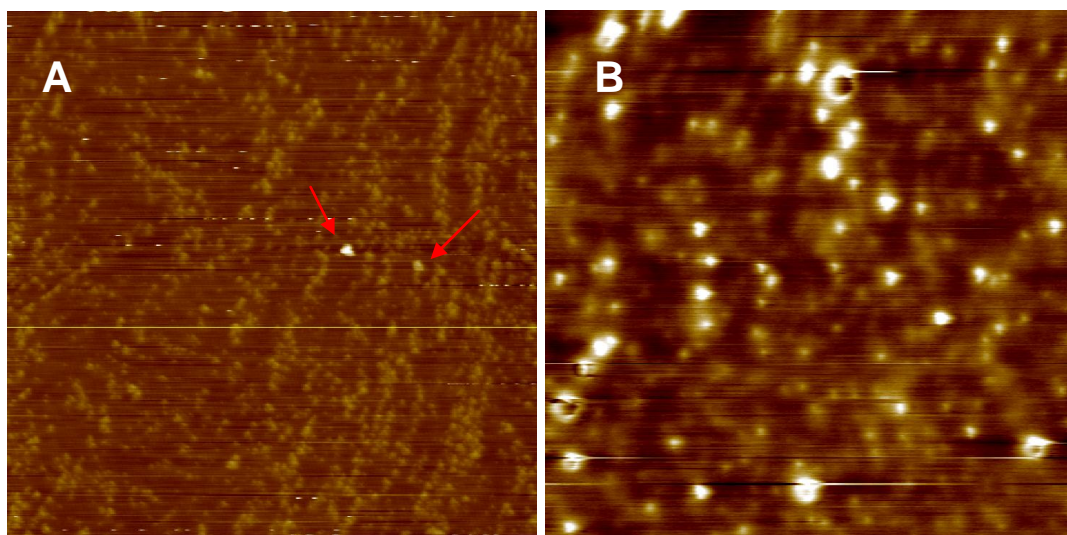


Kuvio 12. Eri näyteolosuhteissa inkuboitujen näytteiden vaikutus signaaliin partikkelimäärityksellä.

DMSO, 1XPBS ja 10 mM HCl -näytteet kuvannettiin AFM:llä. Referenssiksi kuvannettiin myös näyte, joka ei sisältänyt peptidiä, mutta jonka pinnalla oli inkuboitu 1XPBS:ää. Tällä haluttiin varmistaa, etteivät 1XPBS:n sisältämät suolakiteet tartu mican pintaan ja aiheuta vääristyneitä tuloksia kuvannettaessa. Mican pinta näytti tasaiselta ja z-tason korkeuskuvaajan mukaan korkeus vaihteli $\pm 0,2$ nm.

Kuvassa 1 on esitetty DMSO ja 10 mM HCl -näytteiden morfologia. 10 mM HCl -näyte erosi selvästi DMSO-näytteestä sisältäen erikokoisia 1–10 nm korkeita globulaarisia aggregaatteja. Todellisuudessa aggregaatteja ei voitu olettaa täysin globulaarisiksi, sillä x-y-tasossa niiden koko oli suurempi. Kuvassa 2 on esitetty DMSO-näytteen z-tason korkeuskuva. Näyte sisälsi noin 1 nm korkeita partikkeleita, jotka korkeudeltaan voitiin olettaa monomeereiksi tai pieniksi oligomeereiksi²¹. Kuitenkin muutama noin 4 nm korkea aggregaatti oli myös

havaittavissa (kuva 1 A punaiset nuolet). Kuvannetuista näytteistä saadut FRET-signaalit ovat esitettynä kuviossa 12. 1XPBS-näytteen morfologia oli verrattavissa 10 mM HCl -näytteeseen (kuva 1 B). Kirjallisuuden mukaan erityisesti 10 mM HCl -olosuhteissa A β 1–42:n pitäisi muodostaa fibrillejä, joita kuitenkin ei havaittu AFM-kuvannuksessa.



Kuva 1. A β 1–42:n morfologia DMSO:ssa (A) ja 10 mM HCl:ssä (B) inkuboituina. Kuvien x-y-taso on $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ja z-tason korkeus 8 nm. Kuvien resoluutio on 1024x1024 pikseliä.



Kuva 2. A β 1–42:n morfologia DMSO:ssa inkuboituna, z-tason korkeuskuva.

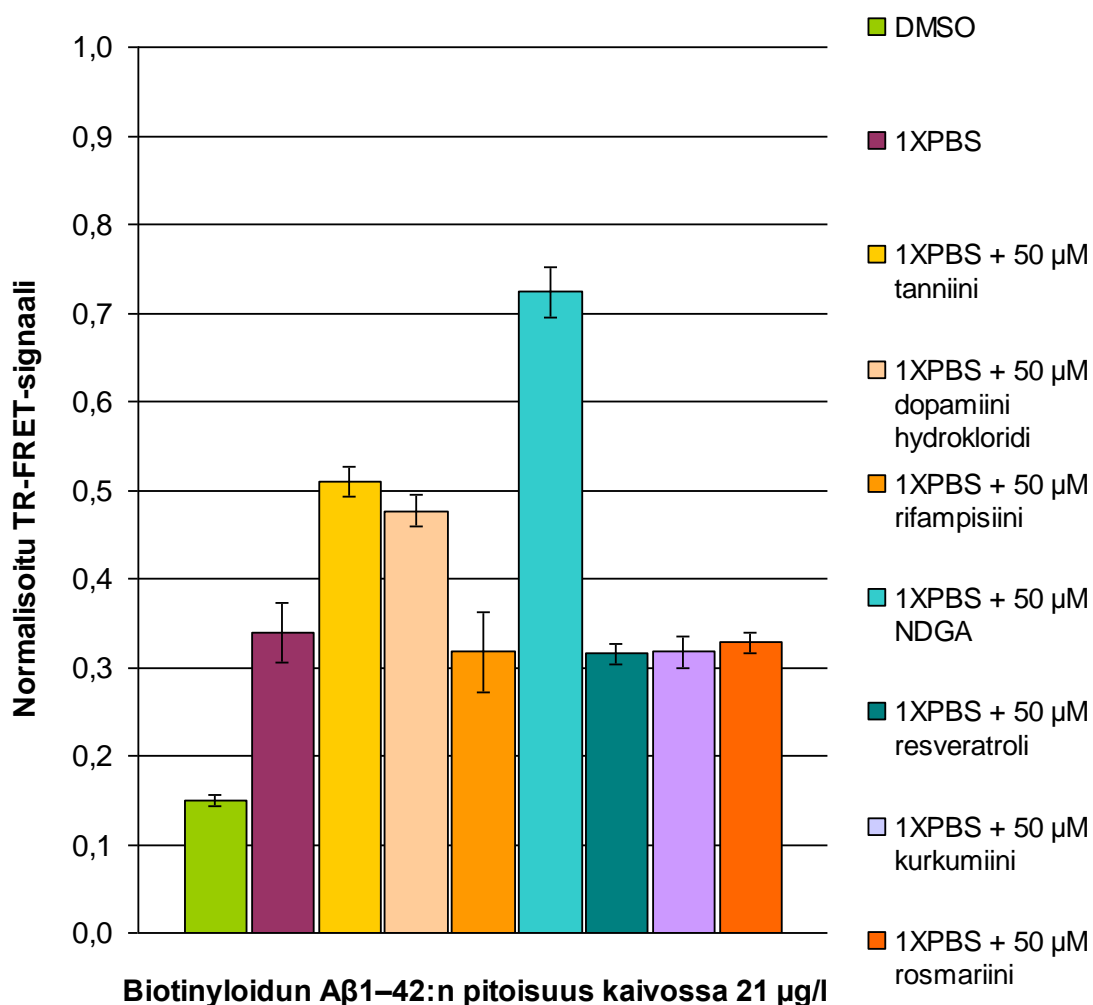
7.2 Lääkeaineiden vaikutus aggregaatioon

Testeissä tutkittiin sellaisia lääkkeitä, joiden on kirjallisuudessa todettu ehkäisevän aggregaatiota. Lääkkeitä testattiin nanopartikkelimäärityksellä ja tioflaviinitestillä. ThT-testien tulokset on esitetty normalisoituina signaaleina. ThT-testissä taustan (5 μM ThT) suhdeluku oli aina 1 ja näytteistä saadut

signaalit olivat >1 . Tuloksissa normalisoituna signaalina on käytetty näytteen ja taustan suhdelukua, josta on vähennetty taustan suhdeluku ((näyte/tausta)-1). Tulokset on laskettu kahden rinnakkaisen näytteen keskiarvoista ja virhepalkit on laskettu rinnakkaisten mittausten variaatiokertoimista (CV).

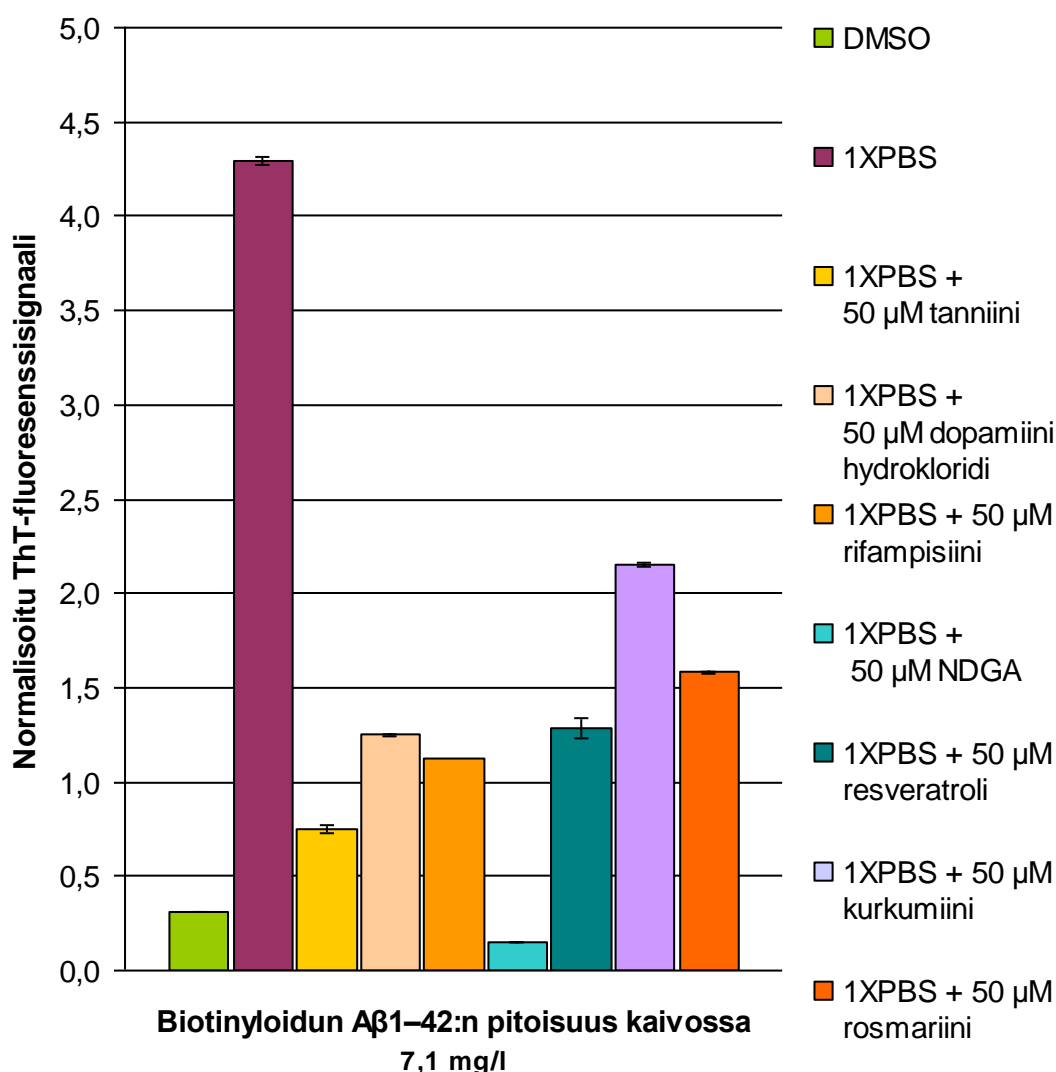
Kuviossa 13 on esitetty nanopartikkelimäärityksellä saadut tulokset lääkeaineiden vaikutuksesta 1XPBS:ssä inkuboiduissa näytteissä. Peptidi oli esikäsitelty HFIP:llä. DMSO ja 1XPBS -näytteiden välinen signaaliero oli jälleen noin 2-kertainen. Nanopartikkelimäärityksen tulosten perusteella mikään testatuista lääkeaineista ei ehkäissyt aggregaatiota 1XPBS-olosuhteessa. Muutamat lääkeainenäytteet (tanniini, dopamiini ja NDGA) antoivat korkeamman signaalin 1XPBS-näytteeseen nähden. Syy signaalin nousuun voi johtua siitä, että nämä lääkeaineet edesauttoivat γ G:n adsorptiota partikkelin pintaan tai ne mahdollisesti tuottivat taustasignaalia.

Partikkelimäärityksellä testattiin lääkeaineiden kontrollinäytteet eli näytteet, jotka eivät sisältäneet peptidiä. Lääkeaineiden ei todettu häiritsevän määrittystä, mutta sitoutuessaan peptidiin niillä saattaa tapahtua spektraalisia muutoksia, kuten esimerkiksi ThT:llä ja ne saattavat fluoresoida mitattavalla alueella. Mahdollisesti lääkeaineet voivat myös osallistua resonanssienergiansiirtoon adsorboituessaan nanopartikkelin pintaan peptidi-lääkeaine-kompleksina, joka voitaisiin havaita fluoresenssin nousuna.



Kuvio 13. Lääkeaineiden vaikutus aggregaatioon 1XPBS:ssä inkuboiduissa näytteissä partikkelimäärityksellä.

Samat näytteet testattiin ThT-testillä, jonka tulokset on esitetty kuviossa 14. ThT-fluoresenssi antoi korkean signaalin 1XPBS-näytteelle, mikä indikoi β -levyrakenteellisista aggregaateista. Kaikki tutkitut lääkeaineet näyttivät vähentävän ThT-fluoresenssia, mikä viittasi vähäisempään β -levyrakenteiden määrään. Näin ollen ThT-testin perusteella kaikki lääkeaineet inhiboivat aggregaatiota. Lisäksi ThT-testillä 1XPBS ja DMSO -näytteiden välinen signaaliero oli huomattavasti suurempi (14-kertainen) partikkelimääritykseen verrattuna (2-kertainen).

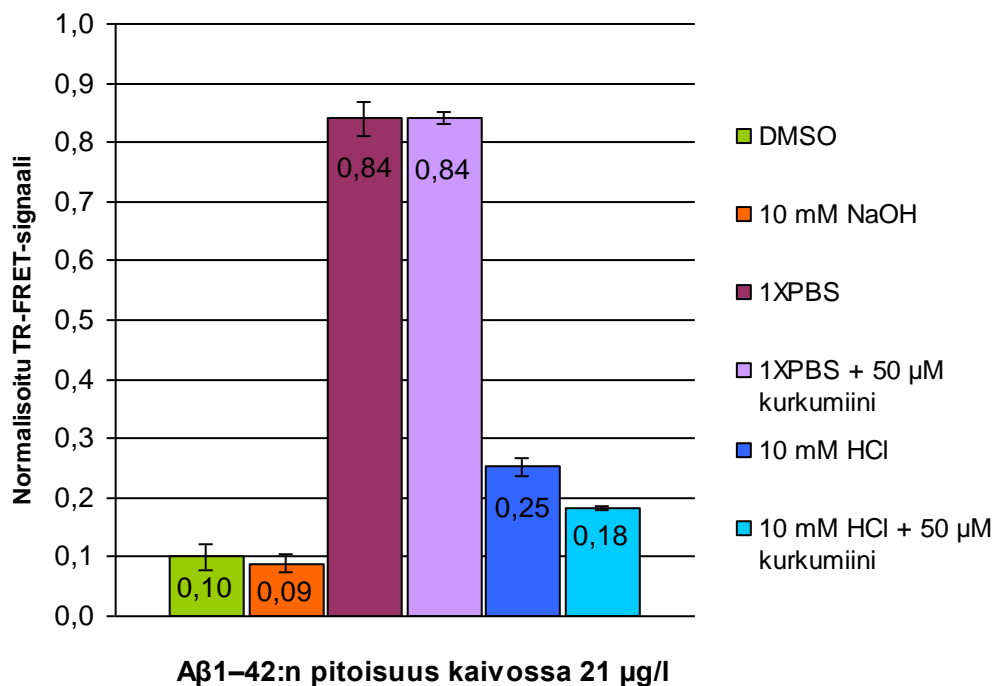


Kuvio 14. Lääkeaineiden vaikutus aggregaatioon 1XPBS:ssä inkuboiduissa näytteissä ThT -menetelmällä.

7.3 Kurkumiinin vaikutus aggregaatioon

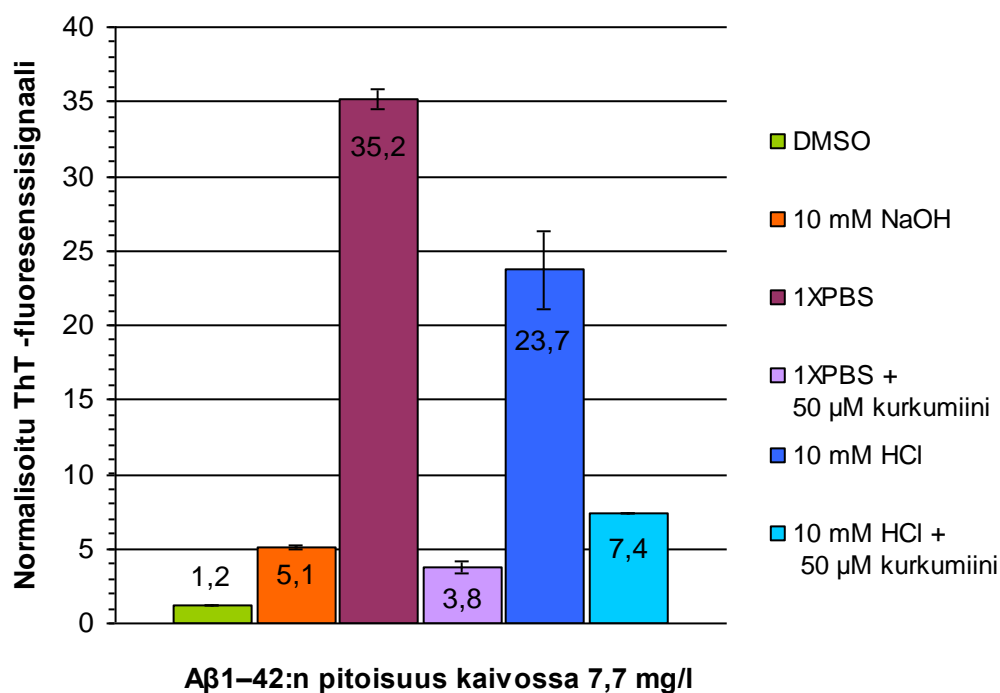
Lääkeaineista kurkumiinin vaikutusta aggregaatioon testattiin myös toisella peptidierällä, joka oli esikäsitelty 10 mM NaOH:lla. Nanopartikkelimäärittäytksen tuloksissa (kuvio 15) DMSO ja 10 mM NaOH -näytteet antoivat matalimman signaalin, jolloin näytteiden oletettiin sisältävän mono- tai pieniä oligomeerimuotoisia peptidejä. 1XPBS-näytteen signaali oli huomattavasti

korkeampi (8-kertainen) eikä 50 μM kurkumiininäytteessä havaittu signaalissa muutosta. Tämä tulos oli yhteneväinen aikaisemman tuloksen kanssa (kuvio 13). 10 mM HCl -näytteessä ei myöskään havaittu suurta muutosta signaalissa 50 μM kurkumiinin läsnä ollessa. Edelleen partikkelimäärityksellä saatiin tulos, että kurkumiinilla ei ole aggregaatiota inhiboivaa vaikutusta.



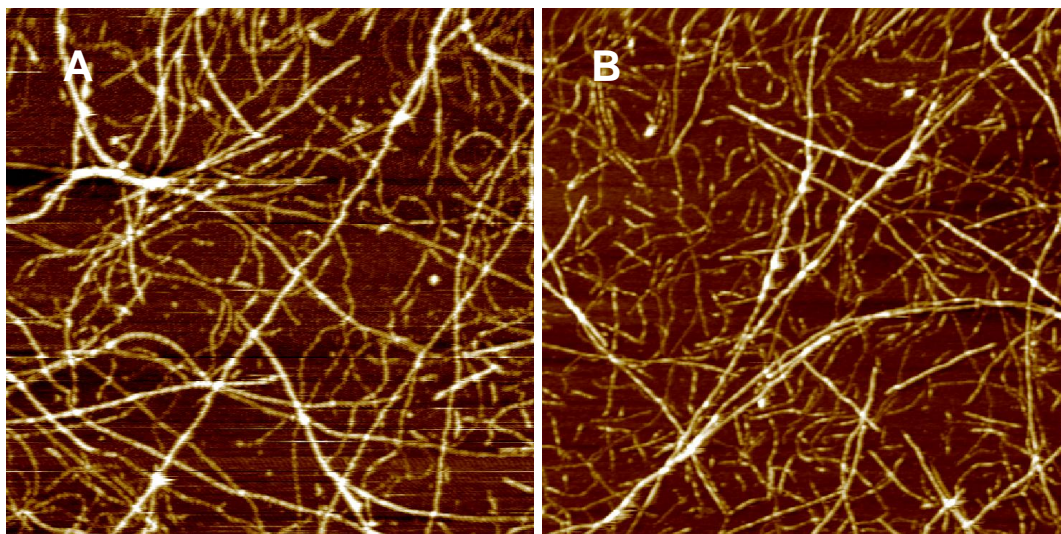
Kuvio 15. Kurkumiinin vaikutus 1XPBS:ssä ja 10 mM HCl:ssä inkuboituihin näytteisiin partikkelimäärityksellä.

Kun samat näytteet testattiin ThT-menetelmällä, kurkumiinia sisältäneet näytteet antoivat selvästi matalamman signaalin (kuvio 16). ThT-testin perusteella 50 μM kurkumiini ehkäisi aggregaattien syntyä, joten myös tämä oli yhteneväinen aikaisemman ThT-testin tuloksen kanssa (kuvio 14). Huomattavaa oli kuitenkin 1XPBS-näytteestä saadun signaalin intensiteetti. 10 mM NaOH:lla esikäsitelty peptidi antoi 1XPBS-näytteessä lähes 35-kertaisen signaalin DMSO-näytteeseen nähden aikaisempaan 14-kertaiseen eroon verrattuna, vaikka kaivossa olevan peptidin pitoisuus oli vain hieman korkeampi.

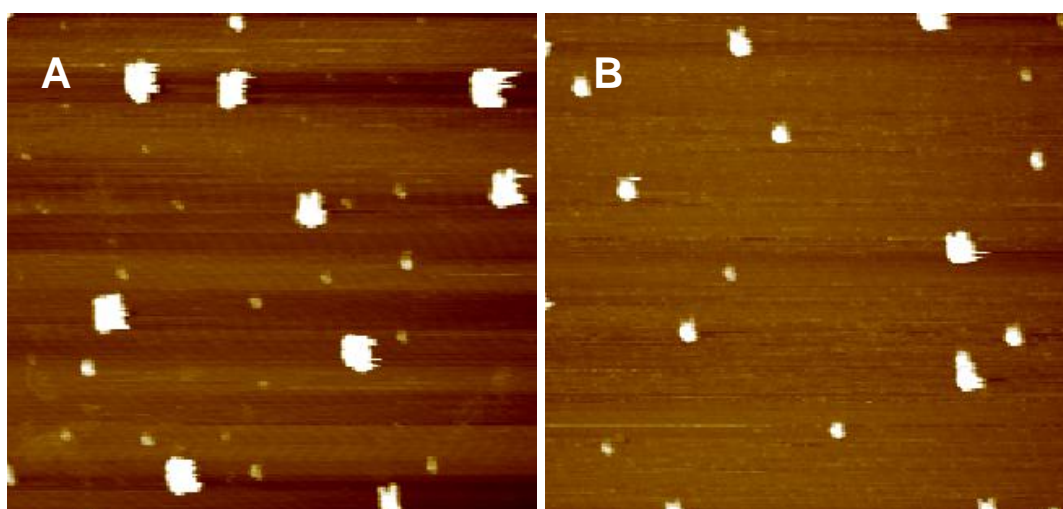


Kuvio 16. Kurkumiinin vaikutus 1XPBS:ssä ja 10 mM HCl:ssä inkuboituihin näytteisiin ThT -menetelmällä.

Kurkumiinin vaikutusta näytteiden morfologiaan testattiin AFM:llä. AFM-kuvien kuvien perusteella kurkumiini ei näyttänyt ehkäisevän aggregaatiota. 10 mM HCl:ssä inkuboidut peptidit muodostivat fibrillejä (kuva 3 A), eikä kurkumiinilla näyttänyt olevan ehkäisevää vaikutusta fibrillien syntyyn (kuva 3 B). Samoin 1XPBS:ssä inkuboidut näytteet ilman kurkumiinia (kuva 4 A) ja kurkumiinin kanssa (kuva 4 B) eivät eronneet toisistaan. Tämä tulos viittasi siihen, että ThT-menetelmällä kurkumiinin läsnäolo antoi vääristyneen aggregaatiota inhihoivan tuloksen ja AFM:llä saadut tulokset puolsivat kehitetyn nanopartikkelimenetelmän tuloksia.



Kuva 3. 10 mM HCl:ssä inkuboitu A β 1–42 ilman kurkumiinia (A) ja 50 μ M kurkumiinin kanssa (B). Kuvien x-y-taso on $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ja z-tason korkeus 8 nm. Kuvien resoluutio on 2048x2048 pikseliä.



Kuva 4. 1XPBS:ssä inkuboitu A β 1–42 ilman kurkumiinia (A) ja 50 μ M kurkumiinin kanssa (B). Kuvannuksessa skannattava alue oli $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ja resoluutio 1024x1024. Kuvissa x-y-taso on $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ja z-tason korkeus 8 nm.

Uudella peptidillä ja esikäsitteilyllä fibrillit saatiin muodostettua. Tämä viittasi siihen, että aikaisemman peptidierän laadussa oli puutteita tai esikäsitteilyllä oli merkittävä vaikutus peptidin myöhempään aggregaatioon inkuboitessa.

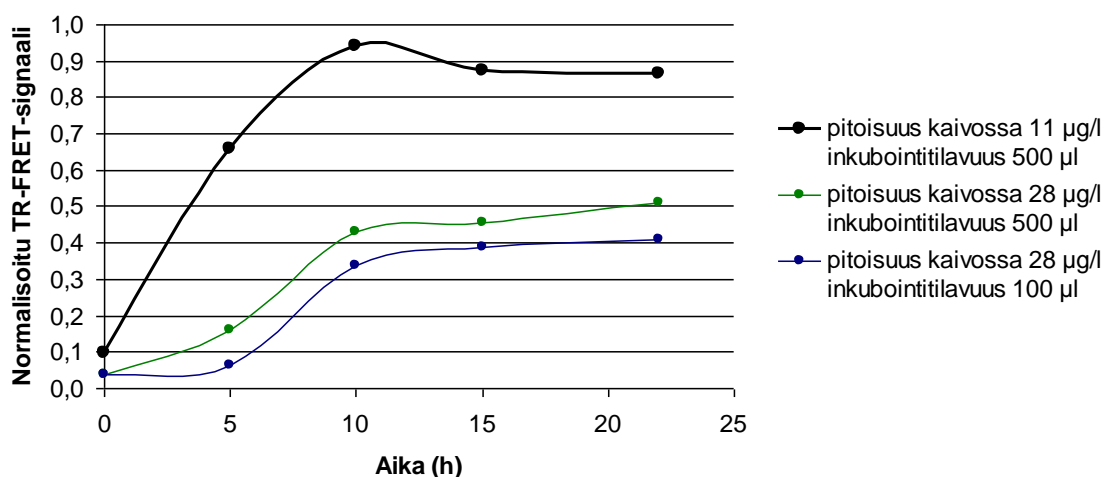
Partikkelimäärityksen tuloksissa DMSO ja 10 mM HCl -näytteiden välinen ero oli vain noin 2-kertainen ja aggregaationäytteiden eli 1XPBS ja 10 mM HCl -

näytteiden välillä havaittiin noin 4-kertainen signaaliero (kuvio 15). AFM-kuvissa 1XPBS-näyte sisälsi suuria noin 1–15 nm korkeita globulaarisia aggregaatteja (kuva 4) kun vastaavasti 10 mM HCl-näytteessä näkyi fibrillejä. Fibrillit olivat noin 1–8 nm korkeita ja monia mikrometrejä pitkiä (kuva 3). Globulaarisissa ja fibrillimuotoisissa aggregaateissa voitiin huomata myös selkeä kokoero x-y-tasossa. DMSO-näytettä ei kuvannettu, joten varmuutta sen morfologiasta ei ole. ThT-testin tuloksen perusteella DMSO-näyte ei kuitenkaan sisältänyt β -levyrakenteellisia aggregaatteja (kuvio 16). Näiden tulosten perusteella vaikutti siltä, että peptidien morfologiset erot vaikuttivat analyytin sitoutumiseen nanopartikkelin pintaan tai näytteiden alkuperäisillä inkubointiolosuhteilla oli vaikutusta saatuihin tuloksiin.

7.4 Fibrillisaation kinetiikkatutkimus

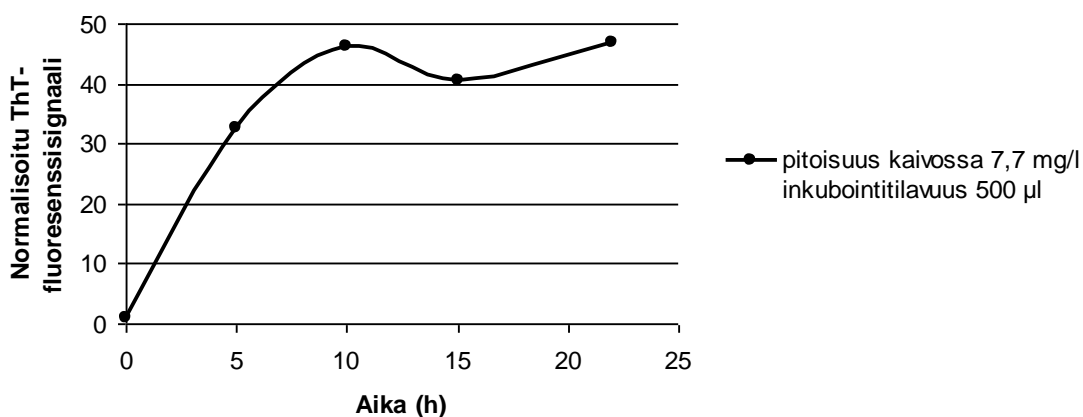
Kehitetyn nanopartikkelimäärityksen toimivuutta testattiin fibrillisaatiota edistävässä 10 mM HCl -olosuhteessa ajan funktiona. Peptidi oli esikäsitelty 10 mM NaOH:lla. Tutkittaviksi aikapisteiksi valittiin 0, 5, 10, 15 ja 22 h. Rinnakkaisina menetelminä käytettiin ThT-testiä ja atomivoimamikroskooppia. Partikkelimäärityksellä testattiin myös kahdessa eri reaktiotilavuudessa inkuboituja näytteitä (100 ja 500 μ l) ja kahta loppukonsentraatiota (11 ja 28 μ g/l).

Kuviossa 17 on esitetty partikkelimäärityksellä saadut tulokset. Kun inkubointitilavuutena oli 500 μ l ja peptidipitoisuus 11 μ g/l, aikapisteessä 5 h signaali oli noussut selvästi ja tavoitti maksimin 10 tunnissa. Aikapisteissä 15 ja 22 h signaali ei enää muuttunut. Näin ollen vaikutti siltä, että fibrillisaatio oli tavoittanut saturaation 10 tunnissa.



Kuvio 17. A β 1–42:n fibrillisaatiokinetiikka partikkelimäärityksellä 10 mM HCl:ssä ajan funktiona.

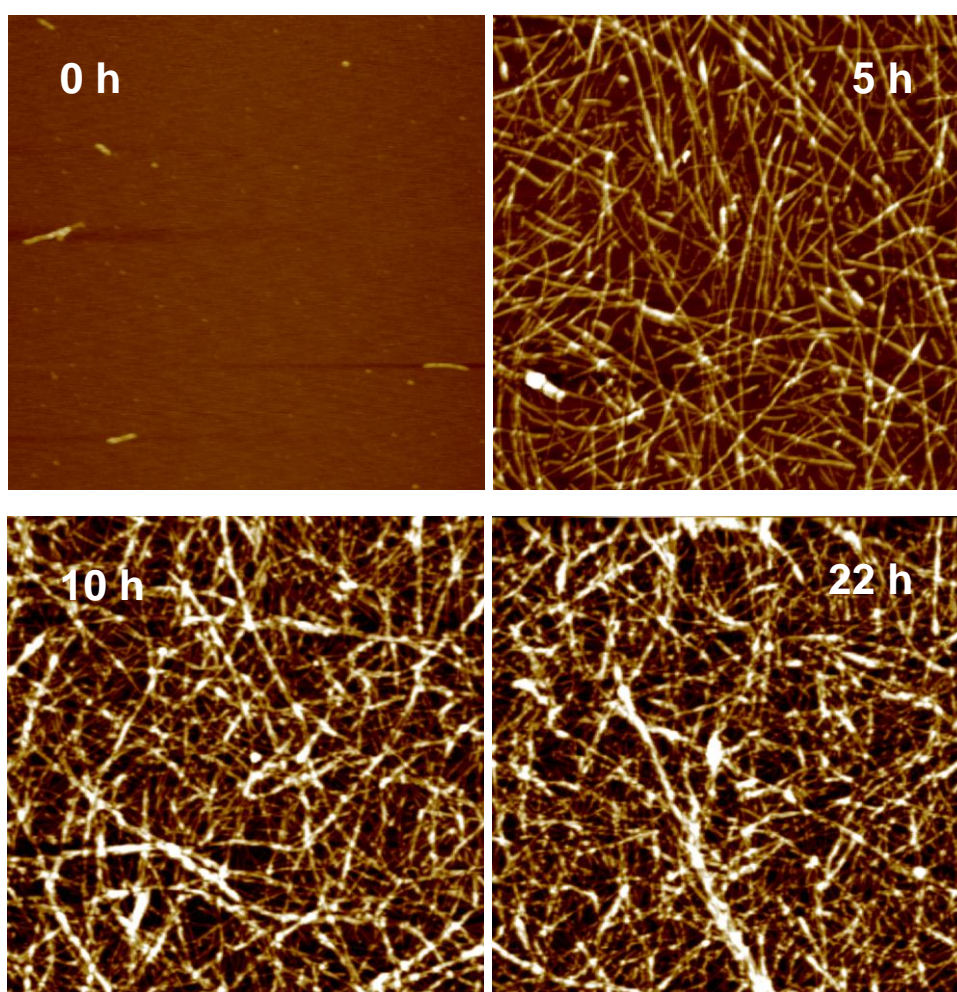
Fibrillisaatiokinetiikkaa tutkittiin samoilla näytteillä samoissa aikapisteissä myös ThT-testillä, jonka tulokset on esitetty kuviossa 18. Aikapisteessä 5 h signaali oli noussut huomattavasti ja fibrillisaatio näytti saavuttavan saturaation 10 tunnissa eli tulokset olivat yhtenevät partikkelimäärityksen kanssa.



Kuvio 18. A β 1–42:n fibrillisaatiokinetiikka ThT-menetelmällä 10 mM HCl:ssä ajan funktiona.

Jokaisessa aikapisteessä valmistettiin näytteet myös AFM-kuvannusta varten. Kuvassa 5 jo aikapisteessä 0 h voitiin erottaa noin 3–5 nm korkeita protofibrillin tyyppisiä muodostelmia ja globulaarisia aggregaatteja. Näin ollen

fibrillisaatioreaktio oli alkanut kehittyä 10 mM HCl:ssä hyvin nopeasti tai 10 mM NaOH ei ollut täysin stabiili varastointiliuos peptidille. Aikapisteessä 5 h voitiin havaita jo tiheä fibrillikanta (kuva 5). Tämä tulos oli yhteneväinen partikkelimäärityksellä ja ThT-testillä saatuihin tuloksiin, joissa 5 tunnissa havaittiin huomattava signaalin nousu (kuviot 17 ja 18). Aikapisteessä 10 h fibrillikanta näytti tiheämmältä, jolloin huomattiin myös signaalin nousua partikkelimäärityksellä ja ThT-testillä. 22 tunnin kohdalla ei huomattavaa muutosta enää tapahtunut, jolloin myös partikkelimäärityksen ja ThT-testin tulosten perusteella oli saavutettu saturaatio.



Kuva 5. Aβ1–42:n fibrillisaatio 10 mM HCl:ssä ajan funktiona. Kuvien x-y-taso on $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$ ja z-tason korkeus 15 nm. Kuvien resoluutio on 512×512 pikseliä.

Kaikissa kolmessa menetelmässä A β 1–42:n fibrillisaatio näytti saavuttavan saturaation 10 tunnissa, eikä varsinaista lag-vaihetta havaittu tai lag-vaihe oli alle 5 h. Testien tulokset noudattivat 1. kertaluvun kinetiikan mallia. AFM-kuvassa (kuva 5) aikapisteessä 0 h voitiin havaita muutamia protofibrillin kaltaisia aggregaatteja, joiden läsnäolon on todettu kiihdyttävän aggregaationopeutta ja fibrillisaation noudattavan 1. kertaluvun kinetiikkaa.

Kinetiikkatutkimuksien tuloksissa on eri tutkimuslaboratorioiden välillä suuria eroja. Kun menetelmänä on käytetty ThT -fluoresenssimenetelmää, lag-vaiheen kesto on vaihdellut 3–13 tunnin välillä ja eksponentiaalisen fibrillisaatiovaiheen jälkeen saturaatio on tavoitettu 12–96 tunnissa.^{11,17,18} Koska esikäsittelymenetelmällä, lähtömateriaalin homogeenisuudella, inkubaatioolosuhteilla ja peptidikonsentraatiolla on merkittävä vaikutus A β -peptidin aggregaatioon, tuloksia on vaikea verrata toisiinsa.

Partikkelimäärityksellä tutkittiin myös inkuboinnin reaktiivilavuuden vaikutusta saatavaan signaaliin suuremmalla peptidikonsentraatiolla kaivossa (kuvio 17). 100 μ l:ssa inkuboitujen näytteiden signaalit olivat matalampia kuin 500 μ l:ssa inkuboiduissa näytteissä, vaikka peptidipitoisuus kaivossa oli sama (28 μ g/l). Reaktiivilavuudella näytti olevan vaikutusta inkuboitavissa näytteissä. Tämä voi osaltaan selittää tutkimuksen aikana tulosten välillä tapahtuneen vaihtelun, sillä näytteiden inkuboinnissa reaktiivilavuudet vaihtelivat 29–55 μ l välillä. Pienemmässä reaktiivilavuudessa samalla sekoitusnopeudella liuos ei liiku yhtä nopeasti kuin suuremmassa reaktiivilavuudessa⁴⁶. Tämä voi vaikuttaa näytteessä tapahtuvaan aggregaatioon.

8 PÄÄTELMÄT JA POHDINTAA

Kirjallisuudessa on huomattu suuria vaihteluita A β -peptidin tutkimustuloksissa sekä eri laboratorioiden välillä että pidemmällä aikavälillä myös samassa laboratoriossa. Tutkimustulosten vaihteluun on epäilty vaikuttavan peptidin valmistaja, valmistuserä ja erityisesti olosuhteet, joita on käytetty näytteiden valmistukseen.¹⁹

Opinnäytetyössä kehitettävän partikkelimäärittelyn tutkimuksissa käytettiin kahden eri valmistajan peptidiä, joista toinen esikäsiteltiin HFIP:llä ja toinen 10 mM NaOH:lla. Tutkimustulokset näiden kahden välillä erosivat toisistaan. On mahdollista, että ero johtui esikäsitelymenetelmästä, sillä 10 mM NaOH:lla esikäsitelty peptidi muodosti fibrillejä 10 mM HCl:ssä inkuboidessa, joita ei havaittu HFIP:llä esikäsitellyissä peptidinäytteissä.

Verrattaessa partikkelimäärittelyn signaaliaroja DMSO ja 1XPBS -näytteiden välillä HFIP:llä ja 10 mM NaOH:lla esikäsitellyillä peptideilla, voitiin huomata, että HFIP:llä esikäsitelty 1XPBS-näyte antoi vain noin 2-kertaisen signaalin DMSO-näytteeseen nähden (kuviot 10, 12 ja 13), kun 10 mM NaOH:lla esikäsitellyillä peptidillä näytteiden välinen ero oli 8-kertainen (kuvio 15). Tämä ero huomattiin myös ThT-testillä, sillä aikaisempi 14-kertainen (kuvio 14) ero nousi 35-kertaiseksi (kuvio 16). Verrattaessa AFM-kuvia keskenään, HFIP:llä esikäsitellyssä peptidinäytteessä erikokoiset aggregaatit täyttivät mican pintaa tiheästi (kuva 1 B), kun taas 10 mM NaOH:lla esikäsitellyssä näytteessä globulaariset aggregaatit erottuivat selvästi yksittäisinä aggregaateina (kuva 4). Näiden huomioiden perusteella vaikutti siltä, että peptidierien laadussa oli eroja.

Peptidierät erosivat toisistaan myös siten, että HFIP:llä esikäsitelty peptidi oli biotinyloitu peptidin aminopäästä. Tällä ei kuitenkaan oletettavasti ole vaikutusta, sillä hydrofobisen karboksyylipään on todettu olevan tärkeämmässä roolissa aggregaation etenemisessä. Eräs tutkimusryhmä on myös todennut, että biotinyloitu peptidi ei eroa biotinyloimattomasta aggregaatiotutkimuksissa³⁴.

Koska HFIP:llä esikäsitellyn peptidin laatu oli kyseenalainen, siitä saatuihin tutkimustuloksiin on syytä suhtautua varautuen. Joitain päätelmiä voitiin kuitenkin tehdä. AFM-kuvissa ja ThT-testeissä DMSO-näyte erosi selvästi muista näytteistä, mutta partikkelimäärityksellä sitä ei kyetty erottamaan yhtä selvästi. ThT-testillä saaduilla tuloksilla ero DMSO ja 1XPBS -näytteen välillä oli selkeä (14-kertainen), kun se partikkelimäärityksellä oli yleensä vain noin 2-kertainen.

Lääkeainetesteissä testattiin seitsemän potentiaalista lääkeainetta, joista viiden lääkeaineen (NDGA:n, kurkumiinin, dopamiinin, rosmariinihapon ja tanniinihapon) fibrillisaatiota inhiboivat tutkimustulokset ovat saman tutkimusryhmän systemaattisen lääkeainetestauksen tulosta. Menetelmänä he olivat käyttäneet kongonpuna- ja ThT-menetelmää sekä elektronimikroskopiaa.^{17,23}

Kurkumiini ei näyttänyt ehkäisevän aggregaatiota partikkelimäärityksen eikä AFM-kuvannuksen perusteella, vaikka se on sekä *in vivo*²⁴ - että *in vitro*^{23,24} - tutkimuksissa tutkittu ehkäisevän. Saman tuloksen on kuitenkin saanut myös toinen tutkimusryhmä. Heidän tutkimuksessa kurkumiini (30 µM) ja NDGA (30 µM) eivät ehkäisseet fibrillisaatiota. Tutkimuksissa he olivat käyttäneet ThT-menetelmää, sameusmittausta ja elektronimikroskopiaa. Vaikka nämä lääkeaineet eivät inhiboineet fibrillisaatiota, ne ehkäisivät oligomeerien syntyä. Samaisessa tutkimuksessa huomattiin, että kun kurkumiinin inhiboivaa vaikutusta testattiin eri tavoin esikäsiteltyyn ja eri liuoksessa aggregoituun peptidiin, kurkumiini ei ehkäissytkään oligomeerien syntyä.¹⁸ Tästä päätellen peptidin käyttäytyminen ja lääkeaineiden toimivuus riippuu ympäristön olosuhteista.

Lääkeainetesteissä partikkelimäärityksellä mitkään lääkeaineista eivät ehkäisseet aggregaattien syntyä, kun vastaavasti ThT-testi näytti kaikkien lääkeaineiden ehkäisevän aggregaatiota. Joidenkin lääkeaineiden on huomattu laskevan ThT-fluoresenssia, vaikka ne eivät olisi inhiboineet fibrillisaatiota. Jotkin polyfenolit ovat luonnostaan fluoresoivia tai saattavat absorboida ThT:n absorptio- tai emissioaallonpituuksilla, mikä voi sammuttaa ThT:n fluoresenssia.

Vaihtoehtoisesti jotkin lääkeaineet saattavat sitoutua fibrillien rakenteeseen siten, että ThT:n sitoutuminen fibrilliin estyy, mikä havaitaan fluoresenssin laskuna.^{18,32}

Partikkelimäärittelyksellä huomattiin fluoresenssin nousua muutamassa lääkeainenäytteessä. Näin ollen sen soveltuvuutta lääkeainetesteihin ei vielä voitu osoittaa luotettavasti. Vaikka lääkeaineet eivät itsessään fluoresoisi mitatulla alueella, niillä saattaa tapahtua spekrimuutoksia sitoutuessaan peptidiin, jolloin ne saattavat fluoresoida mitattavalla alueella. Koska partikkelimenetelmä perustuu aikaerotteisen fluoresenssin detektioon (mittauksen viive 75 μ s), lääkeaineista mahdollisesti muodostuvan fluoresenssin olettaisi sammuneen. Täten saattaa olla, että nämä lääkeaineet häiritsivät FRET-ilmiötä Eu(III)-partikkelin ja γ G-Ax680:n välillä, ja tuottivat siten taustasignaalia.

Verrattaessa 10 mM NaOH:lla esikäsitellyn peptidin eri inkubointiolosuhteissa (DMSO, 1XPBS ja 10 mM HCl) valmistettujen näytteiden tuloksia keskenään, vaikutti siltä, että alkuperäisillä inkubointiolosuhteilla oli toistaiseksi tuntemattomasta syystä vaikutusta määrittelyksessä. Partikkelimäärittelyksellä monomeerisen (DMSO) ja fibrillinäytteen (10 mM HCl) välinen ero oli vain 2-kertainen (kuviot 15), kun taas kinetiikkatutkimuksessa suurimmaksi osaksi monomeerisen ja fibrillinäytteen välille saatiin 9-kertainen ero (kuviot 17), kun näyteolosuhteena molemmissa oli ollut 10 mM HCl. Saattaa myös olla, että alkuperäinen inkubointiolosuhte vaikutti peptidiin siten, että määrittelyksessä sen sitoutuminen partikkelin pintaan oli erilaista.

Kinetiikkatutkimustuloksilla saatiin todistettua, että partikkelimenetelmällä pystytään seuraamaan A β :n fibrillisaatiota ja erottamaan suurimmaksi osaksi monomeerinen näyte ja fibrillinäyte toisistaan, sillä käytetyt rinnakkaismenetelmät tukivat tulosta. Näin ollen kehitetty partikkelimäärittely osoitti potentiaalia vaihtoehtoisena menetelmänä A β -peptidin fibrillisaation havainnointiin ja aggregaatiotutkimuksiin.

Partikkelimäärityksen etu muihin määrittämiin on erityisesti siihen tarvittava pieni näytemäärä. Esimerkiksi kinetiikkatutkimuksessa 11 µg/l peptidikonsentraatiossa kaivossa oli 1 ng näytettä. Aikapisteessä 0 h signaali oli hyvin matala, jolloin analytti täytti partikkelin pintaa niin, ettei γG-Ax680 mahtunut adsorboitumaan. Vastaavasti ThT-testissä näytettä oli kaivossa noin 2 µg eli kaksituhatkertaisesti. AFM-kuvannus antaa selvän informaation näytteen morfologiasta, mutta sen käyttö vaatii taitoa ja kuvantaminen on suhteellisen hidasta. Lisäksi laitehankintana atomivoimamikroskooppi on kallis.

9 YHTEENVETO

Tutkimuksen tavoitteena oli testata uuden menetelmän soveltuvuutta β -amyloidin aggregaatiotutkimuksiin ja potentiaalisten lääkeaineiden vaikutusta aggregaatioon kehitetyllä menetelmällä. Tulosten tulkitsemiseen käytettiin rinnakkaismenetelminä hyvin yleisesti käytettyä tioflaviini T - fluoresenssimenetelmää ja atomivoimamikroskopiaa.

Nanopartikkelimäärityksen soveltuvuus β -amyloidin aggregaatiotutkimuksiin saatiin todistettua fibrillisaation kinetiikkatutkimuksella, sillä käytetyillä rinnakkaismenetelmillä saatiin sama tulos. Fibrillisaatiota pystyttiin seuraamaan 11 $\mu\text{g/l}$ peptidikonsentraatiolla ja suurimmaksi osaksi monomeerinen näyte ja fibrillinäyte pystyttiin erottamaan toisistaan selvänä fluoresenssin resonanssienergiansiirtosignaalien tasoerona, kun alkuperäinen näyteolosuhde oli sama. Eri näyteolosuhteissa valmistettujen näytteiden välille ei saatu yhtä selvää eroa verrattuna rinnakkaismenetelmiin.

Lääkeainetesteissä ThT-menetelmän ja partikkelimäärityksen tulokset antoivat ristiriitaiset tulokset. ThT-testi osoitti kaikkien lääkeaineiden inhiboivan aggregaatiota, kun vastaavasti partikkelimäärityksen tulosten perusteella mikään lääkeaine ei inhiboinut aggregaatiota. AFM:llä kuvannettiin kurkumiinin vaikutusta aggregaatioon, joka oli yhteneväinen partikkelimäärityksen tuloksien kanssa. Kuitenkin muutamat lääkeainenäytteet nostivat energiansiirtosignaalia partikkelimäärityksellä, joten menetelmän soveltuvuutta lääkeainetestauksiin ei vielä voitu osoittaa luotettavasti.

Tutkimukset menetelmän kehitykselle jatkuvat yhä, sillä se on osoittanut potentiaalia vaihtoehtoisena menetelmänä aggregoituneen ja aggregoitumattoman näytteen detektioon. Tärkeää tulevaisuuden tutkimuksissa on systemaattinen rinnakkaismenetelmien käyttö, jolloin saadaan kerättyä informaatiota jokaisesta testatusta näytteestä. β -amyloidipeptidin käyttäytyminen on herkkä ympärillä vallitseville olosuhteille ja tästä syystä näytteiden valmistusolosuhteet pitäisi myös pitää samanlaisina.

10 KIITOKSET

Tutkimus suoritettiin Turun yliopiston lääketieteelliseen tiedekuntaan kuuluvassa Biofysiikan laboratoriossa, jossa on kehitetty onnistuneesti muun muassa monia vaihtoehtoisia epäspesifisiä luminesenssiin perustuvia proteiinipitoisuusmääritysmenetelmiä. Opinnäytetyön kohteena ollut partikkelimäärityksen kehittäminen β -amyloidiaggregaattien havainnointiin osoittautui haasteelliseksi tutkimustyöksi. Niin saaduissa tutkimustuloksissa kuin kirjallisuudessa voitiin huomata vaihtelua, jotka osoittivat β -amyloidipeptidin olevan herkkä vallitseville olosuhteille.

Haluan kiittää opinnäytetyöni toimeksiantajaohjaajaa Sari Pihlasaloa ja Harri Härmää sekä tutkimuksessa mukana vaikuttanutta Francisco Lopezia aivoriihipalavereista sekä koko Biofysiikan laboratorion työntekijöitä hyvästä työilmapiiristä ja mielenkiintoisista keskusteluista. Lisäksi haluan antaa erityiskiitokset atomivoimamikroskoopin käytön opastuksesta ja teknisestä tuesta Tuomas Näreojalle ja Takahiro Deguchille.

Kiitokset kuuluvat myös opinnäytetyöohjaajalleni Ilari Suomiselle kannustavista palavereista koko opinnäytetyöprosessini aikana, ja opinnäytetyöni oponoijalle Elina Pietilälle, joka toimi erittäin tärkeänä henkisenä tukena opinnäytetyöni kirjoitusvaiheessa.

LÄHTEET

- ¹ Juva, K. (2011) Terveyskirjasto. Lääkärikirja Duodecim. Alzheimerin tauti. Viitattu 17.1.2012 http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00699
- ² Tohtori.fi (2008) Alzheimerin tauti. Viitattu 18.1.2012 <http://www.tohtori.fi/?page=2134015&id=2663822>
- ³ Re, F.; Airolidi, C.; Zona, C.; Masserini, M.; La Ferla, B.; Quattrocchi, N. & Nicotra, F. (2010) Beta amyloid aggregation inhibitors: Small molecules as candidate drugs for therapy of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **17**: 2990-3006.
- ⁴ LeVine, H. (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*. **2**: 404-410.
- ⁵ Takahashi, R. H.; Nam, E. E.; Edgar, M. & Gouras, G. K. (2002) Review. Alzheimer β -amyloid peptides: Normal and abnormal localization. *Histol Histopathol.* **17**: 239-246.
- ⁶ Murphy, R. M. (2002) Peptide aggregation in neurodegenerative disease. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**: 155-174.
- ⁷ Heino, J. & Vuento, M. (2007) Biokemian ja solubiologian perusteet. 1. painos. ss. 55, 58-60. WSOY Oppimateriaalit Oy, Helsinki.
- ⁸ Wang, W.; Nema, S. & Teagarden, D. (2010) Review. Protein aggregation: Pathways and influencing factors. *Int. J. Pharm.* **309**: 89-99.
- ⁹ Snyder, S. W.; Lador, U. S.; Wade, W. S.; Wang, G. T.; Barret, L. W.; Matayoshi, E. D.; Huffaker, H. J.; Krafft, G. A. & Holzman, T. F. (1994) Amyloid- β aggregation: Selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophys. J.* **67**: 1216-1228.
- ¹⁰ DaSilva, K. A.; Shaw, J. E. & McLaurin, J. (2010) Review. Amyloid- β fibrillogenesis: Structural insight and therapeutic intervention. *Exp. Neurol.* **223**: 311-321.
- ¹¹ Bartolini, M.; Naldi, M.; Fiori, J.; Valle, F.; Biscarini, F.; Nicolau, D. V. & Andrisano, V. (2011) Kinetic characterization of amyloid-beta 1-42 aggregation with a multimethodological approach. *Anal. Biochem.* **414**: 215-225.
- ¹² Barghorn, S.; Nimmrich, V.; Striebinger, A.; Krantz, C.; Keller, P.; Janson, B.; Bahr, M.; Schmidt, M.; Bitner, R. S.; Harlan, J.; Barlow, E.; Ebert, U. & Hillen, H. (2005) Globular amyloid β -peptide 1-42 oligomer: a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **95**: 834-847.
- ¹³ Krafft, G. A. & Klein, W. L. (2010) Review. ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. **59**: 230-242.
- ¹⁴ Chimon, S.; Shaibat, M. A.; Jones, C. R.; Calero, D. C.; Aizezi, B. & Ishii, Y. (2007) Evidence of fibril-like β -sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's β -amyloid. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**: 1157-1164.
- ¹⁵ Wu, J. W.; Breydo, L.; Isas, J. M.; Lee, J.; Kuznetsov, Y. G.; Lange, R. & Glabe, C. (2010) Fibrillar oligomers nucleate the oligomerization of monomeric amyloid β but do not seed fibril formation. *J. Biol. Chem.* **285**: 6071-6079.

- ¹⁶ Harper, J. D.; Wong, S. S.; Lieber, C. M. & Lansbury, P. T. Jr. (1999) Assembly of A β amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochem.* **38**: 8972-8980.
- ¹⁷ Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H. & Yamada, M. (2004) Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1690**: 193-202.
- ¹⁸ Necula, M.; Kaye, R.; Milton, S. & Glabe, C. G. (2007) Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid β oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J. Biol. Chem.* **282**: 10311-1032.
- ¹⁹ Hou, L.; Shao, H.; Zhang, Y.; Li, H.; Menon, N. K.; Neuhaus, E. B.; Brewer, J. M.; Byeon, I.-J. L.; Ray, D. G.; Vitek, M. P.; Iwashita, T.; Makula, R. A.; Przybyla, A. B. & Zagorski, M. G. (2004) Solution NMR studies of the A β (1-40) and A β (1-42) peptides establish that the Met35 oxidation state affects the mechanism of amyloid formation. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 1992-2005.
- ²⁰ Shen, C. L. & Murphy, R. M. (1995) Solvent effects on self-assembly of β -amyloid peptide. *Biophys. J.* **69**: 640-651.
- ²¹ Stine, W. B. Jr.; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A. & LaDu, M. J. (2003) *In vitro* characterization of conditions for amyloid- β peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**: 11612-11622.
- ²² Porat, Y.; Abramowitz, A. & Gazit, E. (2006) Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem. Biol. Drug. Des.* **67**: 27-37.
- ²³ Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H. & Yamada, M. (2004) Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Journal of Neuroscience Research.* **75**: 742-750.
- ²⁴ Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A. & Cole, G.M. (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **280**: 5892-5901.
- ²⁵ Kenkel, J. (2003) Analytical chemistry for technicians. 3. painos. ss. 216-218. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- ²⁶ Harris, D. C. (2007) Quantative chemical analysis. 7. painos. ss. 390-392. W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- ²⁷ Tinoco, I. Jr.; Sauer, K. & Wang, J. (1995) Physical chemistry: Principles and applications in biological sciences. 3. painos. ss. 545, 549-550, 568-571, 574, 576. Prentice-Hall, Inc., A Simon & Schuster Company, Upper Saddle River, New Jersey.
- ²⁸ Seery, M. (2012) The photochemistry portal. Viitattu 19.4.2012 <http://photochemistryportal.net/home/index.php/category/principles/>
- ²⁹ Holme, D. J. & Peck, H. (1998) Analytical biochemistry. 3. painos. s. 47, 73, 75. Addison Wesley Longman Limited, Essex, UK.
- ³⁰ Hemmälä, I.; Ståhlberg, T. & Mottram, P. (1994) Bioanalytical applications of labelling technologies. ss. 84-86, 99, 105. Wallac, an EG&G company, Turku, Suomi.

- ³¹ Life Technologies corporation (2012) Fluorescence energy transfer (FRET) –Note 2.1. Viitattu 5.3.2012 <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer-FRET.html>
- ³² Hudson, S. A.; Ecroyd, H.; Kee, T. W. & Carver, J. A. (2009) The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *Febs. J.* **276**: 5960-5972.
- ³³ Krebs, M. R. H.; Bromley, E. H. C. & Donald, A. M. (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: Localisation and implications. *J. Struct. Biol.* **149**: 30-37.
- ³⁴ Maezawa, I.; Hong, H.-S.; Liu, R.; Wu, C.-Y.; Cheng, R. H.; Kung, M.-P; Kung, H. F.; Lam, K. S.; Oddo, S.; LaFerla, F. M. & Jin, L.-W (2008) Congo red and thioflavin-T analogs detect A β oligomers. *J. Neurochem.* **104**: 457-468.
- ³⁵ Khurana, R.; Coleman C.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Krishna, V.; Grover, R. K.; Roy, R. & Singh, S. (2005) Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **151**: 229-238.
- ³⁶ Agilent Technologies Inc. (2008) Agilent Technologies 5500 Scanning Probe Microscope User's guide. Manual part number N9410-9001.
- ³⁷ Morris, V. J.; Gunning, A. & Patrick Kirby, A. R. (2009) Atomic microscopy for biologists. ss. 7, 12, 31, 58. Imperial College Press, Lontoo, Iso-Britannia.
- ³⁸ Kosek, J. (2011) Atomic force microscopy (AFM). Viitattu 17.4.2012 <http://www.vscht.cz/pre/research/afm.html>
- ³⁹ Fezoui, Y.; Hartley, D. M.; Harper, J. D.; Khurana, R.; Walsh, D. M.; Condrón, M. M.; Selkoe, D. J.; Lansbury, P. T. Jr., Fink, A. L. & Teplow, D. B. (2000) An improved method of preparing the amyloid beta-protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments. *Amyloid.* **7**: 166-178.
- ⁴⁰ Bourhim, M.; Kruzel, M.; Srikrishnan, T. & Nicotera, T. (2007) Linear quantitation of A β aggregation using Thioflavin T: Reduction in fibril formation by colostrinin. *J. Neu. Meth.* **160**: 264-268.
- ⁴¹ Pihlasalo, S.; Kirjavainen, J.; Hänninen, P. & Härmä, H. (2011) High sensitivity luminescence nanoparticle assay for the detection of protein aggregation. *Anal. Chem.* **83**: 1163-1166.
- ⁴² Pihlasalo, S.; Pellonperä, L.; Martikkala, E.; Hänninen, P. & Härmä, H. (2010) Sensitive fluorometric nanoparticle assays for cell counting and viability. *Anal. Chem.* **82**: 9282-9288.
- ⁴³ Condie, R. M. (1981) Pure intravenous human and animal gamma globulins. United States patent 4296027.
- ⁴⁴ Expasy (2012) Compute pI/Mw tool. Viitattu 1.4.2012 http://web.expasy.org/compute_pi/
- ⁴⁵ Invitrogen (2012) Alexa Fluor® Dye selection guide. Viitattu 1.6.2012 http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell_tissue_analysis/pdfs.Par.87420.File.tmp/O-063190-Alexa-Fluor-SelectionGuide.pdf
- ⁴⁶ Quantifoil Instruments GmbH (2012) Optimization of mixing parameters. Viitattu 8.3.2012 <http://www.qinstruments.com/en/applications/optimization-of-mixing-parameters.html>